

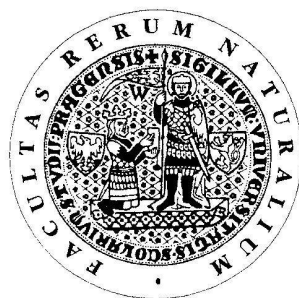
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Jan Mika

VYUŽITÍ ELEKTROD NA BÁZI UHLÍKU PRO ELEKTROCHEMICKOU  
DETEKCI V PRŮTOKOVÝCH METODÁCH

Application of carbon based electrodes for electrochemical detection in flow system

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Hana Dejmková

Praha 2012

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 16. května 2012.

**Tato práce byla finančně podporována z následujících finančních zdrojů a grantů:**

MSM 0021620857 (Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy)

SVV 2012-265201 (Karlova Universita v Praze)

TA01020565 (Technologická agentura České republiky)

Touto cestou chci poděkovat především mé vedoucí Mgr. Haně Dejmkové za odborné vedení a hlavně za čas, který mi ochotně věnovala.

Velký dík patří Mgr. Miroslavu Hylišovi, PhD. za proškolení a asistenci při práci na skenovacím elektronovém mikroskopu a Mgr. Ondřeji Šebestovi z Laboratoře konfokální a fluorescenční mikroskopie z UK v Praze za pořízení mikroskopických snímků povrchu uhlíkové pastové elektrody.

RNDr. Václavu Červenému, PhD. děkuji za rady a půjčený materiál potřebný na konstrukci coulometrického detektoru.

Prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. a Prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. děkuji za podporu a cenné připomínky k mé diplomové práci.

V neposlední řadě bych rád poděkoval mé rodině, která mi studium umožnila a po celou jeho dobu mě podporovala.

## **Abstrakt:**

Uhlík je pro své elektrochemické vlastnosti oblíbeným pracovním materiálem používaným ke konstrukci detektorů, které jsou vhodné i pro průtokové metody. V této práci budou diskutovány dvě nejčastěji používané techniky detekce, a to amperometrická a coulometrická.

Představitelem amperometrických detektorů jsou uhlíkové pastové elektrody (CPE), jejichž hlavním nedostatkem je nízká stabilita v prostředích s vysokým obsahem organických rozpouštědel, která jsou běžnou součástí mobilní fáze HPLC. Tímto nedostatkem již netrpí uhlíkové pasty ze skelného uhlíku (GCPE). V této práci jsou popsány změny povrchu a odezvy elektrody vyvolané působením methanolu a vysvětlen mechanismus zvýšené stability GCPE. Konfokální mikroskopie prokázala, že vlivem methanolu dochází ke zhrubnutí povrchu, které vede k nárůstu výšky píků, šumu a pozadí měření a posunu potenciálu píku k méně pozitivním hodnotám při voltametrických měřeních. Tyto změny jsou závislé na době působení methanolu na elektrodu a na jeho koncentraci.

Coulometrické detektory pracují s vysokým stupněm konverze a citlivostí, ale jejich reaktivace v případě pasivace je relativně komplikovanou záležitostí a vyžaduje výměnu pracovního materiálu. Úspory času a financí lze dosáhnout použitím detektorů s vyměnitelnou náplní. Tento způsob reaktivace je rozvíjen a inovován při vývoji nového coulometrického detektoru, přičemž jako modelové analyty slouží hexakyanoželezitan draselný a hydrochinon. Pro obě látky bylo dosaženo vysokého stupně konverze 90,1 %, respektive 81,7 %. Detektor pracuje s dobrou stabilitou signálu i reprodukovatelností jednotlivých měření, relativní směrodatná odchylka se v obou případech pohybuje okolo 2 %. Podařilo se prokázat správnou funkčnost detektoru a způsobu obnovy jeho náplně. Diskutovány jsou i nedostatky stávající konstrukce a kroky nutné k dokončení před použitím detektoru na stanovení reálných vzorků.

**Abstract:**

Carbon is due to its electrochemical properties a favourite material for construction of electrodes suitable for detection in flow system. The two most often used techniques (coulometric and amperometric) will be discussed in this Thesis.

Carbon paste electrodes (CPE) represent the amperometric detectors. CPE are unstable in the medium with high content of organic solvents, which might complicate their application in HPLC, where the mobile phase contains organic component. It is interesting, that glassy carbon paste electrodes are more stable under such conditions. The change of surface and response of the electrode caused by the effect of methanol are described in this Thesis along with the possible reason of stability of GCPE. Roughing of the surface exposed to methanol is demonstrated by confocal microscopy. This effect leads to increase of height of the peak, background current and noise and to the shift of peak potential to less positive values. These changes are dependent on the time of exposure and the concentration of methanol.

Coulometric detectors work with high conversion effectiveness and sensitivity, but in case of their passivation, reactivation is a relatively complicated problem, often leading to the replacement of electrode material. Answer to this problem can be given by using renewable electrochemical detectors. This type of reactivation is innovated during the development of new type of coulometric detector using potassium ferrocyanide and hydroquinone as model analytes. The conversion effectiveness for ferrocyanide is 90,1 % and for hydroquinone is 81,7 %. The response of detector is stable and its reproducibility is about 2 % for both analytes. Remaining deficiencies and improvements necessary for the practical applications are discussed.

**Klíčová slova:**

Amperometrická detekce, coulometrická detekce, detektor s obnovitelnou náplní, konfokální mikroskopie, uhlíkové pasty, skelný uhlík, methanol.

**Key words:**

Amperometric detection, coulometric detection, renewable electrochemical detector, confocal microscopy, carbon paste, glassy carbon, methanol.

## Obsah:

1.	Úvod .....	12
1.2.	Cíle práce .....	12
1.2.1.	Změny povrchové struktury pastové elektrody z mikročástic skelného uhlíku vyvolané působením roztoku methanolu .....	12
1.2.2.	Tubulární coulometrický detektor plněný mikročásticemi skelného uhlíku .....	12
2.	Teoretická část .....	13
2.1.	Elektrochemická detekce v průtokových metodách .....	13
2.2.	Konstrukce elektrochemických detektorů .....	14
2.3.	Uhlík jako materiál pracovní elektrody .....	15
2.3.1.	Skelný uhlík .....	16
2.3.2.	Uhlíkové pastové elektrody .....	17
2.4.	Amperometrická detekce s wall-jet uspořádáním .....	19
2.5.	Tubulární pórovitý coulometrický detektor .....	20
2.5.1.	Coulometrická detekce .....	20
2.5.2.	Tubulární uspořádání detektoru .....	20
2.5.3.	Porézní coulometrické detektory .....	21
2.5.4.	Porézní detektory s obnovitelnou náplní .....	22
3.	Experimentální část .....	23
3.1.	Změny povrchové struktury pastové elektrody z mikročástic skelného uhlíku vyvolané působením roztoku methanolu .....	23
3.1.1.	Použité chemikálie .....	23
3.1.2.	Přístrojové vybavení .....	24
3.1.3.	Pracovní postupy .....	25
3.1.3.1.	Určování šumu měření DC voltametrie .....	25
3.2.	Tubulární coulometrický detektor plněný mikročásticemi skelného uhlíku .....	26
3.2.1.	Použité chemikálie .....	26
3.2.2.	Přístrojové vybavení .....	26
4.	Výsledky a diskuze .....	28
4.1.	Změny povrchové struktury pastové elektrody z mikrokuliček skelného uhlíku vyvolané působením roztoku methanolu .....	28
4.1.1.	Voltametrické chování .....	28
4.1.1.1.	Vliv methanolu přítomného v měrné cele na odezvu GCPE .....	28
4.1.1.2.	Porovnání působení methanolu vsádkovou a průtokovou metodou .....	29

4.1.1.3.	Studium změn odezvy signálu vyvolaných působením methanolu na povrch GCPE .....	31
4.1.1.4.	Elektroda ze skelného uhlíku .....	33
4.1.2.	Mikroskopická studie.....	35
4.1.3.	Detekce v průtokových metodách .....	36
4.1.3.1.	Hydrodynamický voltamogram.....	36
4.1.3.2.	Stálost signálu.....	37
4.1.3.3.	Ověření změn v chování GCPE.....	38
4.1.4.	Měření hustoty.....	40
4.2.	Tubulární coulometrický detektor plněný mikročásticemi skelného uhlíku....	41
4.2.1.	Základní konstrukce coulometrického detektoru .....	41
4.2.2.	Konstrukční úpravy coulometrického detektoru .....	43
4.2.2.1.	Úpravy vedení vzorku od dávkovací cívky k detektoru .....	43
4.2.2.2.	Změna rozměrů výstupní kapiláry.....	44
4.2.2.3.	Změna způsobu zavedení kontaktu.....	48
4.2.3.	Plnění coulometrického detektoru .....	49
4.2.3.1.	Princip plnění coulometrického detektoru .....	49
4.2.3.2.	Způsoby plnění detektoru.....	49
4.2.3.3.	Regulace výšky uhlíkového sloupce v coulometrickém detektoru ...	50
4.2.3.4.	Výpočet pórovitosti .....	51
4.2.3.5.	Výpočet teoretické výšky uhlíkového sloupce potřebné pro elektrochemickou reakci.....	51
4.2.3.6.	Experimentální ověření vlivu výšky sloupce na odezvu detektoru ...	52
4.2.3.7.	Mikroskopická studie vlivu tlaku na mikročástice skelného uhlíku .	53
4.2.3.8.	Možná automatizace plnění dávkovací cívky .....	54
4.2.4.	Stanovení hexakyanoželezitanu draselného jako modelové látky.....	54
4.2.4.1.	Hydrodynamický voltamogram.....	54
4.2.4.2.	Závislost průtokové rychlosti.....	56
4.2.4.3.	Objem dávkování.....	57
4.2.4.4.	Stupeň konverze .....	58
4.2.4.5.	Stálost signálu a reprodukovatelnost měření.....	59
4.2.4.6.	Kalibrační závislost .....	60
4.2.5.	Stanovení hydrochinonu coulometrickým detektorem.....	61



4.2.5.1.	Hydrodynamický voltamogram hydrochinonu .....	62
4.2.5.2.	Selektivita detektoru a stupeň konverze při stanovení hydrochinonu.....	62
4.2.5.3.	Vliv průtokové rychlosti na odezvu detektoru .....	65
4.2.5.4.	Vliv objemu vzorku na odezvu detektoru .....	66
4.2.5.5.	Stálost odezvy při kontinuálním měření hydrochinonu .....	67
4.2.5.6.	Kalibrační přímka při stanovení hydrochinonu .....	68
5.	Závěr.....	70
5.1.	Změny povrchové struktury pastové elektrody z mikročástic skelného uhlíku vyvolané působením roztoku methanolu .....	70
5.2.	Tubulární coulometrický detektor plněný mikročásticemi skelného uhlíku ....	71
6.	Seznam použité literatury .....	73

## Seznam symbolů a zkratek:

$a$	celková otevřená plocha pórů
$A$	plocha průřezu kapiláry
$a_p$	průměr přívodní kapiláry
B-R pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
$c$	koncentrace
CPE	uhlíkové pastové elektrody
$d$	průměr výstupní kapiláry
$D$	difúzní koeficient
$E$	potenciál
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál
$F$	Faradayova konstanta [ $F = 9,6485.104 \text{ C mol}^{-1}$ ]
FIA	průtoková injekční analýza
FI-RES	obnovitelný elektrochemický senzor
GCPE	uhlíkové pastové elektrody z mikročástic skelného uhlíku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$I$	proud
$I_{lim}$	limitní proud
$I_p$	výška píku
$k$	konstanta popisující laminární a turbulentní proudění
$l$	délka výstupní kapiláry
$L$	délka detektoru
$m_0$	koeficient přenosu hmoty
$Q$	náboj
$r$	poloměr uhlíkových mikročástic
$R$	molární plynová konstanta [ $8,314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ]
$R_{el}$	poloměr elektrody
$R_{konv}$	stupeň konverze
RSD	relativní směrodatná odchylka
RVC	retikulární uhlík (vysoce pórovitý)
$s$	specifický povrch pórovité elektrody
$S$	plocha píku

SEM	skenovací elektronová mikroskopie
$t$	čas
$T$	teplota
$u$	povrchová průtoková rychlost
$v_f$	lineární průtoková rychlost
$V_{vz}$	objem vzorku
$W$	šířka píku v polovině jeho výšky
$z$	počet vyměněných elektronů
$\varepsilon$	pórovitost
$\varphi$	hustota uhlíkové pasty

## **1. Úvod**

### **1.2. Cíle práce**

#### **1.2.1. Změny povrchové struktury pastové elektrody z mikročástic skelného uhlíku vyvolané působením roztoku methanolu**

Uhlíkové pasty z grafitu se v prostředí s obsahem organických složek rozkládají, jelikož je rozpuštěna pastovací kapalina, která slouží jako opora uhlíkových částic. Uhlíkové pasty připravené z mikročástic skelného uhlíku (GCPE) a běžné pastovací kapaliny tomuto jevu odolávají. Mechanismus této zvýšené stability není znám.

Cílem této části diplomové práce je objasnit mechanismus zvýšené stability GCPE v prostředí vodných roztoků methanolu a prozkoumání vlivu různých koncentrovaných methanolických roztoků na elektrochemické chování GCPE.

#### **1.2.2. Tubulární coulometrický detektor plněný mikročásticemi skelného uhlíku**

Měření v průtokových systémech s coulometrickou detekcí je již řadu let používanou technikou, ale díky technickému rozvoji a rozšíření prostoru pro jejich aplikace jsou možnosti jejich inovace dnes prakticky větší než v době jejich představení. Achillovou patou moderních coulometrických porézních detektorů je obtížná reaktivace pasivovaného povrchu pracovních elektrody.

Cílem této části je zkonstruovat coulometrický porézní detektor s obnovitelnou náplní, což by vedlo k vyřešení problému pasivace pracovního materiálu. Vyvíjený detektor bude plněn sférickými mikročásticemi skelného uhlíku a na základě jeho chování bude popřípadě upravena základní konstrukce tak, aby bylo dosaženo lepších výsledků. Pro ověření správné funkčnosti detektoru byla zvolena modelová látka hexakynoželezitan draselný. Posledním cílem je zkonstruovaný detektor použít pro stanovení hydrochinonu a přiblížit tak tuto konstrukci analytickému využití.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Elektrochemická detekce v průtokových metodách

V moderní analytické chemii se běžně setkáváme se stanovováním analytů v proudu kapalin, tento typ měření se uplatňuje například v průmyslu, při měření v životním prostředí atd. Nejdůležitější částí průtokových systémů jsou detektory, na které jsou proto kladeny velké nároky, důležitá je především kvalita stanovení, ale nezanedbatelná je i cena jednotlivého stanovení.

Obecně musí detektory konstruované pro stanovování v průtoku kapalin být citlivé, s lineární odezvou, s dlouhou stabilitou signálu, reprodukovatelné a selektivní. Elektrochemické detektory tyto podmínky splňují a zároveň jde o přístroje levné a jednoduché, což z nich dělá ideální kandidáty pro detekci v průtokových systémech. Elektrochemické detektory se dále vyznačují rychlou odezvou, přesností, výhodou je i možnost snadné miniaturizace (snižování mrtvého objemu), což je důležité zejména při použití kapilárních kolon, kde je právě malý rozměr použitého detektoru jedním z hlavních parametrů jeho konstrukce. Za nedostatek se považuje menší množství elektrochemicky aktivních látek, to na druhou stranu zvyšuje selektivitu elektrochemické detekce.

Pro elektrochemickou detekci v průtoku kapalin se používají metody založené na elektrochemických vlastnostech stanovovaného roztoku (konduktometrie), metody využívající jevy v elektrické dvojvrstvě (tenzometrie, elektrokinetické jevy proudění) a především samotné elektrochemické metody [1].

Tyto elektrochemické metody lze dále rozdělit dle řízeného parametru. Při rovnovážné potenciometrii se pracuje s nulovým celkovým proudem a není řízen žádný parametr. V ostatních elektrochemických metodách se pracuje s nenulovým celkovým proudem a je řízen potenciál nebo proud (amperometrie, stacionární voltametrie, coulometrie atd.), tyto metody se liší zejména v experimentálním uspořádání.

Nejdůležitější techniky detekce jsou amperometrie a coulometrie. Proudová odezva amperometrického detektoru je funkcí celkové koncentrace stanovované látky, jejíž celkové množství je při tomto ději sníženo jen nepatrně, detektor pracuje s nízkou elektrochemickou konverzí (řádově desetiny až jednotky procent). V coulometrických detektorech je naproti tomu elektrochemická konverze vysoká a dosahuje takřka 100 %,

jelikož veškerý analyt procházející detektorem je oxidován nebo redukován, z prošlého náboje lze pak určovat celkové množství stanovované látky.

Aby bylo dosaženo 100% konverze, musí být dostatečná plocha elektrody a stanovovaná látka musí mít dostatek času na kontakt s povrchem pracovní elektrody (je nutné pracovat při nízkých průtokových rychlostech), pak lze náboj vyvolaný průchodem stanovované látky vypočítat z Faradayových zákonů. Vzhledem k těmto podmínkám je náročné aplikovat tyto detektory pro běžné HPLC kolony, protože je obtížné dosáhnout optimální průtokové rychlosti pro separaci a detektor zároveň a dosáhnout dostatečně malého objemu měrné cely. I přes to se tyto detektory k detekci v HPLC používají. Coulometrie je dále vhodná pro kontinuální monitorování v průmyslu, mikrokolonovou a kapilární HPLC a pro elektrochemickou derivatizaci látek před samotnou detekcí.

Další nevýhody coulometrické a amperometrické detekce (respektive elektrochemické detekce obecně) jsou problematika pasivace a nutnost vodivosti nosného roztoku. Předpokládá se, že v průtokových metodách je pasivace výrazně menší, než při vsádkovém uspořádání, jelikož pracovní elektroda je v kontaktu se vzorkem jen po krátkou dobu a následně je omývána tokem nosného roztoku. Na druhou stranu experimentální uspořádání detektoru často komplikuje jeho mechanické čištění. Elektrochemické detektory mohou také vykazovat problémy s nedostatečnou reprodukovatelností povrchu pracovní elektrody. I přes tyto drobné nedostatky jsou elektrochemické detektory oblíbenou technikou detekce v průtokových metodách.

## **2.2. Konstrukce elektrochemických detektorů**

Pro konstrukci elektrochemického detektoru je nejdůležitější k jakému účelu přesně bude tento detektor sloužit. Podle tohoto kritéria je pak nutné určit materiál pracovní elektrody, typ měřící cely a zvolit měřící techniku.

Materiál pracovní elektrody je volen tak, aby byla elektroda jednoduchá na přípravu, stabilní v čase a dávala dobrý poměr signál/šum. Jak dokazuje i celá řada prací, těmto požadavkům dobře vyhovují rtuť [2], platina [3], zlato [4] a uhlík [5]. Jde o nejpoužívanější materiály pro konstrukci pracovní elektrody elektrochemického

detektoru. Méně ušlechtilé materiály jsou méně vhodné, protože na nich může docházet k vedlejším reakcím.

Měrná cela je konstruována s důrazem na citlivost a reprodukovatelnost měření. Možnosti uspořádání detektoru jsou rozmanité (rovinná, tubulární, kuželová, disková s kolmým průtokem, rotující disková, rtuťová kapka v toku atd.), nejběžněji se pak používají uspořádání wall-jet, tenkovrstvá cela a tubulární detektory.

### **2.3. Uhlík jako materiál pracovní elektrody**

Uhlík je jeden z nejpoužívanějších elektrochemických materiálů pro konstrukci pracovních elektrod vhodných zejména pro oxidace v anodické části potenciálového okna. Oproti elektrodám z kovových materiálů se uhlíkové elektrody obecně vyznačují menším zbytkovým proudem, menší oxidací povrchu a nižšími pořizovacími náklady.

Výhodou uhlíku je jeho variabilita, jež je dána množstvím jeho vyskytujících se forem, od nejběžněji používaného grafitu, až po diamantové elektrody. Tato rozmanitost forem má za následek i různorodost ve vlastnostech konstruovaných elektrod.

Přírodní grafit je porézní materiál, do póru může vnikat stanovovaná látka a elektrody na bázi grafitu mají tedy obtížně definovatelný povrch. Tímto nedostatkem již netrpí pyrolytický grafit a skelný uhlík, protože jde o méně pórovité formy. Jejich povrch se dá leštit, výsledkem je elektroda s dobře definovaným povrchem. Naopak retikulární uhlík (RVC) je vysoce porézní s velkým vnitřním průměrem pórů, a tedy s nízkým hydrodynamickým odporem. Jde o speciální formu skelného uhlíku, i když její elektrochemické vlastnosti jsou obdobné. Diamantové elektrody jsou oblíbené pro nízké hodnoty šumu a zbytkového proudu, dále se vyznačují širokým potenciálovým oknem a vykazují větší odolnost vůči pasivaci. Další možností jsou směsi uhlíku s dalšími složkami, jejichž představiteli jsou uhlíkové pastové elektrody (směs uhlíku a inertní kapaliny) a elektrody kompozitní, ve kterých je inertní kapalina nahrazena tuhými polymery. Kompozitní elektrody mají větší mechanickou odolnost a reprodukovatelnější povrch než uhlíkové pastové elektrody.

### 2.3.1. Skelný uhlík

V roce 1962 připravili Yamada a Sato pro plyn neprostupný materiál na bázi uhlíku, který nazvali skelný uhlík [6]. Jde o materiál rozdílný od ostatních forem uhlíku svými fyzikálními vlastnostmi (tabulka 2.1). Způsob přípravy navíc umožňuje tvorbu různorodých tvarů. Skelný uhlík je připravován zahříváním fenol-formaldehydových pryskyřic.

Skelný uhlík má dobré mechanické a elektrochemické vlastnosti. Jako konstrukční materiál pro elektrody je vhodný, protože zaručuje široké potenciálové okno, dobrou reprodukovatelnost výsledků, nízký elektrický i tepelný odpor a chemickou inertnost. Tento materiál je navíc vysoce odolný vůči teplotě, tvrdý, vykazuje menší pórovitost (tabulka 2.2) než grafit a má vysokou hustotu, díky jeho fyzikálním vlastnostem ho lze vyleštit takřka až do zrcadlového lesku. Díky těmto přednostem jde o vhodnou formu uhlíku pro konstrukci inertních elektrod, které lze úspěšně používat jak při pozitivních, tak i negativních potenciálech. Jako veškeré uhlíkové materiály má nízké hodnoty zbytkového proudu, i když ne tak nízké jako například uhlíkové pastové elektrody [7]. Některé jeho další důležité vlastnosti a jejich porovnání s impregnovaným grafitem jsou uvedeny v tabulce 2.1 a 2.2.

Jak již bylo zmíněno, výhodou tohoto materiálu je, oproti dalším formám uhlíku, možnost připravit částice různého tvaru i velikostí. Skelný uhlík se tedy neuplatňuje jen ve formě pevné elektrody, ale jsou připravovány i komplikovanější struktury a náplně vhodné například pro konstrukci jak coulometrických [8], tak i tubulárních detektorů [9].



Tabulka 2.1 Vybrané vlastnosti skelného uhlíku a jejich porovnání s impregnovaným grafitem [6].

	skelný uhlík	impregnovaný grafit
teplotní odolnost (°C)	1300	1300
hustota (g cm <sup>-3</sup> )	1,46 – 1,50	1,75 – 1,92
pevnost v tahu (kg cm <sup>-2</sup> )	500 – 1000	400 – 500
elektrochemický odpor (10 <sup>-4</sup> Ω cm)	35 – 50	9 – 11
propustnost plynu (cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	10 <sup>-11</sup> – 10 <sup>-12</sup>	10 <sup>-4</sup> – 10 <sup>-6</sup>
koefficient teplotní roztažnosti (10 <sup>-6</sup> K)	1,8 – 2,2	2,0 – 2,5

Tabulka 2.2 Pórovitost různých forem uhlíku [6].

	celkový objem pórů %	maximální velikost pórů nm
grafit	32	7·10 <sup>3</sup>
impregnovaný grafit	5	7·10 <sup>2</sup>
skelný uhlík	0,35	1·10 <sup>2</sup>

### 2.3.2. Uhlíkové pastové elektrody

Uhlíkové pastové elektrody (CPE) představil Adams v roce 1958 [10] a za více než 50 let jejich existence se staly oblíbeným a dobře prostudovaným elektrochemickým materiálem, který je hojně využíván i dnes. Jde o jednu z prvních elektrod použitých jako elektrochemický detektor pro HPLC [11]. Původní záměr připravit materiál na bázi uhlíku vhodný pro kapající elektrodu pro anodickou část potenciálového okna, se vzhledem k fyzikálním vlastnostem směsi nepodařilo realizovat. Připravená směs částic uhlíku a pastovací kapaliny byla však zajímavým elektrochemickým materiálem, který lze plnit do těla elektrody s pístem. Velkou předností tohoto uspořádání je snadné obnovování pasivovaného povrchu elektrody. Část pasty, která podlehlá pasivaci, je možné jednoduše vytlačit z těla elektrody a otřít například pomocí filtračního papíru.

CPE se snadno připravují, jsou levné, mají dobré elektrochemické vlastnosti (které vychází z použité formy uhlíku) a díky částečnému charakteru souboru mikroelektrod (uhlík je rozptýlený v matrici izolátoru) mají nízký zbytkový proud a šum – dobrý limit detekce a malý ohmický pokles napětí. Nejdůležitější výhodou je však jejich snadná modifikovatelnost. Elektrody lze modifikovat záměnou jedné ze základních složek uhlíkové pasty, lze použít rozdílnou formu uhlíku a jiné pastovací kapaliny. Další možností modifikace je přidání jedné nebo více složek do pasty [12, 13]. Pro přípravu byly vyzkoušeny různé formy uhlíku od grafitu [10] přes práškový diamant [14] až po moderní nanomateriály, jako jsou fullereny [15]. Stejná rozmanitost se týká i pastovacích kapalin, lze například použít silikonový olej [10], uhlovodíky [10], anorganické kyseliny [16] a nebo iontové kapaliny [17]. Tím je tomuto materiálu propůjčena široká variabilita vlastností a výrazně rozšířena možnost jejich aplikace [12, 13, 18-20].

Naopak mezi nevýhody tohoto elektrochemického materiálu lze zařadit nerovnost, a tedy i horší reprodukovatelnost povrchu, menší mechanickou odolnost CPE při vysokých průtokových rychlostech, rozpustnost CPE v organických rozpouštědlech a absorpci kyslíku do pasty. Kyslík se do pasty dostává absorpcí uhlíkového materiálu během přípravy pasty. Jeho odstranění je velice komplikované. Přítomnost kyslíku pak způsobuje velký zbytkový proud při elektrochemické redukci [21].

Dalším velkým omezením v použitelnosti těchto elektrod je pak rozpustnost uhlíkové pasty, respektive pastovací kapaliny v organických rozpouštědlech. Takřka všechny pastovací kapaliny s dobrými elektrochemickými vlastnostmi trpí tímto nedostatkem [12, 18, 22]. Celou řadu organických elektrochemicky aktivních látek je však nutné, vzhledem k jejich špatné rozpustnosti ve vodě, rozpouštět právě v organických rozpouštědlech. Organická rozpouštědla se také běžně používají při práci v HPLC systémech, kde se používá především methanol a acetonitril jako složka mobilní fáze [12, 18, 22]. V těchto případech uhlíkové pasty připravené z grafitu nejsou vhodným pracovním materiálem pro konstrukci pracovních elektrod.

Tento nedostatek pomohlo překonat i zavedení uhlíkových pastových elektrod ze skelného uhlíku (GCPE) [23]; tato elektroda byla následně v roce 2001 použita i jako voltametrický detektor [24]. GCPE jsou připraveny ze sférických mikročástic skelného uhlíku a z pastovací kapaliny, nejčastěji minerálního oleje. Zvláštní je, že za nestabilitu

uhlíkové pasty v prostředí obsahujícím organická rozpouštědla je zodpovědná pastovací kapalina, nikoliv uhlíková složka pasty, přesto vykazují GCPE větší stabilitu v tomto prostředí oproti pastám připraveným z grafitu [25]. GCPE jsou běžně používány pro stanovení v organickém prostředí [26-30], ačkoliv přesný důvod pro jejich zvýšenou resistenci není doposud znám.

Minerální olej je v organickém rozpouštědle určitě rozpustný. Například v čistém methanolu dosahuje jeho rozpustnost několika procent, ačkoliv při snižování koncentrace methanolu klesá rozpustnost minerálního oleje až o dva řády [31]. Malé množství pastovací kapaliny na povrchu pasty je však v kontaktu s velkým nadbytkem organického prostředí, což zejména platí v průtokových systémech. Tento nadbytek je dostatečný pro rozpouštění a vymývání pastovací kapaliny z povrchu elektrody a může vést až k jejímu rozkladu.

## 2.4. Amperometrická detekce s wall-jet uspořádáním

První měrné cely s uspořádáním wall-jet sestrojil Matsuda [32] a tento systém se posléze uplatnil i v průtokových metodách. Nedostatkem této konstrukce byla náročná výroba, jejíž zjednodušení přineslo zavedení cel s velkým objemem [33]. Wall-jet uspořádání je oblíbenou detekční technikou používanou v průtokových metodách [29, 30].

V uspořádání wall-jet je přívodní kapilára umístěna kolmo na povrch pracovní elektrody. Ústí přívodní kapiláry je v blízkosti tohoto povrchu, aby byl analyt v dostatečném kontaktu s povrchem pracovní elektrody, i přesto jde o techniku s nízkým stupněm konverze používanou pro amperometrickou detekci. Amperometrická detekce je založena na měření proudu při konstantním voleném elektrickém potenciálu, z hodnoty limitního proudu se určuje koncentrace stanovované látky.

Pro uspořádání wall-jet byla odvozena rovnice popisující vztah limitního proudu a koncentrace stanovované látky [32]:

$$I_{lim} = 1,15 \cdot z \cdot F \cdot c \cdot D^{2/3} \cdot a_p \cdot R_{el}^{3/4}, \quad (2.1)$$

kde  $D$  je difúzní koeficient [ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ],  $a_p$  je průměr přívodní kapiláry [cm],  $R_{el}$  je poloměr elektrody [cm]. Ostatní symboly mají obvyklý význam. Tato rovnice platí v případě, že průměr elektrody je větší než průměr přívodní kapiláry. Tento vztah ukazuje, že limitní

proud je lineární funkcí koncentrace stanovované látky, což je potvrzeno i experimentálními výsledky, ale směrnice tohoto vztahu se již s experimentálními výsledky neshoduje. Odchylky jsou způsobeny specifickými efekty elektrodových materiálů a odchylkami toku od laminárního proudění.

## 2.5. Tubulární pórovitý coulometrický detektor

### 2.5.1. Coulometrická detekce

Odezva coulometrického detektoru je závislá na hmotnosti stanovované látky přicházející do kontaktu s pracovní elektrodou podle Faradayových zákonů. Měří se prošlý náboj při konstantní hodnotě pracovního potenciálu. Coulometrické detektory se vyznačují vysokým stupněm konverze a rychlou odezvou.

Aby detektor pracoval s vysokým stupněm konverze, je zapotřebí dostatečně velký povrch pracovní elektrody a je nutné pracovat při nízkých průtokových rychlostech. Velkého povrchu pracovní elektrody lze dosáhnout použitím rovinné elektrody o velké ploše [8], použitím velké tubulární kovové elektrody, nebo za použití sloupce granulovaných a porézních materiálů.

### 2.5.2. Tubulární uspořádání detektoru

Tubulární uspořádání je vhodné pro detekci v průtokových metodách, protože je konstrukčně jednoduché a hydrodynamicky dobře definované. Rovnice limitního proudu tubulárního detektoru je dána vztahem [34]:

$$I_{lim} = 2,01 \cdot z \cdot F \cdot D^{2/3} \cdot L^{2/3} \cdot a_p \cdot R_{el}^{2/3} \cdot v_f^k \cdot c, \quad (2.2)$$

kde  $L$  je délka detektoru [cm],  $v_f$  je lineární rychlost [ $\text{ml min}^{-1}$ ],  $k$  je konstanta (pro laminární proudění  $k = 0,33$ , pro turbulentní proudění  $k = 1$ ) a ostatní symboly nabývají obvyklých významů. Linearita vztahu mezi limitním proudem a koncentrací je v dobré shodě s experimentálním měřením, naopak směrnice tohoto vztahu nikoliv (ze stejných důvodů jako u rovnice (2.1)).

### 2.5.3. Porézní coulometrické detektory

Jak bylo již uvedeno, coulometrický detektor potřebuje velký aktivní povrch a jednou z možností, jak tohoto požadavku dosáhnout, je použití porézního materiálu jako pro přípravu pracovní elektrody. Vhodnou náplní detektoru můžou například být porézní kovy [35], částice kovu [36], RVC [37, 38], uhlíkové částice [39] atd.

Rovnice pro limitní proud porézních detektorů lze vyjádřit matematickým vztahem:  $I_{lim} = R_{konv} \cdot z \cdot F \cdot c \cdot v_f$ ,

(2.3)

kde  $R_{konv}$  je stupeň konverze a ostatní symboly byly již zmíněny nebo mají běžný význam. Stupeň konverze lze teoreticky určit z rovnice [40]:

$$R_{konv} = 1 - \exp\left(-\frac{m_o \cdot s \cdot a \cdot L}{v_f}\right), \quad (2.4)$$

kde  $m_o$  je koeficient přenosu hmoty [ $\text{cm s}^{-1}$ ],  $a$  je celková otevřená plocha pórů [ $\text{cm}^2$ ] a  $s$  je specifický povrch pórovité elektrody [ $\text{cm}^{-1}$ ]. Význam ostatních symbolů je obvyklý. Celkovou otevřenou plochu pórů lze určit z pórovitosti  $\varepsilon = a/A$ , kde  $A$  je plocha průřezu kapiláry coulometrického detektoru [ $\text{cm}^2$ ], ve které je naplněný uhlík. Měrnou plochu lze určit ze vztahu  $s = a/(L \cdot A)$ .

Koeficient přenosu hmoty lze pro malé sférické částice o poloměru  $r$  vypočítat podle rovnice [41]:

$$m_o = 0,730 \cdot D^{2/3} \cdot u^{1/3} \cdot r^{-2/3}, \quad (2.5)$$

kde  $u$  [ $\text{cm s}^{-1}$ ] je povrchová průtoková rychlost  $u = v_f/(\varepsilon \cdot a)$ ,  $\varepsilon$  je pórovitost a  $D$  je difúzní koeficient [ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ], za který lze v tomto případě dosadit hodnotu  $1,18 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$  [42] a  $r$  je poloměr uhlíkových částic sférického tvaru [ $\text{cm}$ ].

Největším nebezpečím pro porézní pracovní elektrodu je pasivace. Velký povrch elektrody sice zaručuje zvýšenou odolnost proti tomuto ději, ale když je pracovní materiál již jednou pasivován, je jeho reaktivace velice obtížná, takřka nemožná [43].

Problematická je i volba materiálu pro výrobu pracovního detektoru, jelikož některé materiály jsou nedostatečně porézní, a mají tedy příliš malý aktivní povrch, který neumožňuje dosáhnout 100% stupně konverze. Původně bylo k vyřešení tohoto problému nutné po nástřiku vzorku zastavit tok nosného roztoku a umožnit tak úplnou elektrolýzu vzorku. Tímto nedostatkem trpěly tubulární detektory s pracovní diskovou

elektrodou ze skelného uhlíku [44] a tubulární detektory plněné porézním grafitem [45]. Naopak porézní skelný uhlík už měl dostatečně velký aktivní povrch a jeho použitím odpadla potřeba zastaveného toku [46].

#### **2.5.4. Porézní detektory s obnovitelnou náplní**

Hlavní slabinou porézních detektorů je problematika pasivace, která klade překážku jejich častějšímu použití. Obzvláště při stanovení reálných vzorků s komplexní matricí má pasivace výrazný vliv. K odstranění tohoto problému je nutné periodicky obnovovat povrch [47]. Metody s mechanickou obnovou [48] nejsou v případě porézních detektorů prakticky možné. Čistící oxidační a redukční cykly pro kovové materiály [49] komplikují práci s detektorem. Nejjednodušším způsobem je tedy výměna pasivované porézní elektrody, která je však časově i finančně náročná, jelikož vyžaduje rozebrání části přístroje a náhradu pasivované elektrody za novou. Používání elektrod s obnovitelnou náplní složenou z mikročástic pracovního materiálu však přináší možnost tento nedostatek jednoduše odstranit vyprázdněním a náhradou pasivovaných částic za nové, kdykoliv je potřeba. K plnění detektoru stačí jen malé množství pracovního materiálu (snížení finanční náročnosti) a ten je možné volit podle řešeného analytického problému (detektor je univerzálnější). Zároveň odpadá potřeba reverzibility elektrodových dějů.

Tento způsob plnění vyžaduje technickou inovaci. První kroky v tomto směru podstoupili Pollema a Růžička pracující na “jet ring“ elektrodě [50, 51], která byla použita ke konstrukci obnovitelného elektrochemického senzoru pro průtokovou injekční analýzu (FI-RES) [52]. Jet ring elektroda se skládá z kapiláry kolmo vedené na neprostupnou destičku obsahující referentní a pracovní elektrodu. Kapilára a destička na sebe zcela nedoléhají, aby bylo umožněno proudění kapaliny. Mezera mezi nimi není však dostatečně velká, aby mohly unikat i částice pracovního materiálu. V případě jejich pasivace je kapilára přizvednuta a částice jsou tlakem kapaliny vytlačeny z kapiláry. Při práci s metodou FI-RES byl senzor testován jako amperometrický detektor, velký důraz byl kladen na reprodukovatelný systém plnění detektoru s možnou úpravou výšky náplně, aby byl dobře definovaný objem náplně. K plnění detektoru byl použit grafitový prášek a částice skelného uhlíku o velikosti částic 80 – 200  $\mu\text{m}$ .

### 3. Experimentální část

#### 3.1. Změny povrchové struktury pastové elektrody z mikročástic skelného uhlíku vyvolané působením roztoku methanolu

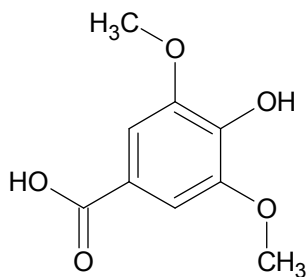
##### 3.1.1. Použité chemikálie

Jako modelová látka pro studii změn povrchu uhlíkové pastové elektrody byla zvolena syringová kyselina ( $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich, USA) (obr 3.1) ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ). Struktura této látky zaručuje snadnou elektrochemickou oxidaci, zároveň jde o látku dobře rozpustnou jak ve vodě, tak i v methanolu.

Jako základní elektrolyt pro DC voltametrii a nosný roztok v případě metody FIA byl použit Brittonův-Robinsonův (B-R) pufr o pH 3 [53]. Zásaditá složka B-R pufru byla připravena z hydroxidu sodného (98 %, Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR), kyselá složka z kyseliny fosforečné (84 % – 87 %, Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR), kyseliny borité (99,5 %, Lachema, Brno, ČR) a octové kyseliny (99 %, Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR).

Jako organické rozpouštědlo, jehož vliv na změnu povrchu uhlíkové pasty byl studován, byl vybrán methanol (p.a.  $\geq 99,9\%$ , Merck, Německo).

Všechny vodné roztoky byly připraveny z deionizované vody (Millipore Q-plus systém, Millipore, USA).



Obr. 3.1 Chemická struktura syringové kyseliny

### 3.1.2. Přístrojové vybavení

Stálost zásobního roztoku kyseliny syringové byla ověřována spektrometricky na přístroji 8453 UV-Visible Spectrophotometer (Agilent Technologies, USA), za použití 1 mm křemenné kyvety. Z těchto měření byla určena i vhodná vlnová délka pro nastavení UV detektoru ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).

Pro mikroskopickou studii povrchu uhlíkové pasty byl použit konfokální mikroskop Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems, Německo).

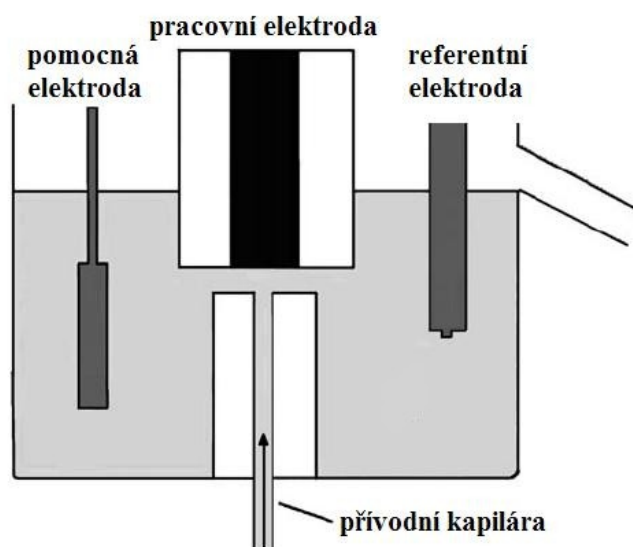
Pro měření pH při přípravě pufrů byl používán pH metr 3510 (JenWay, Velká Británie).

Voltametrická měření byla provedena pomocí Eco-Tribo-Polarografu (PolaroSensors, Praha, Česká republika) s tříelektrodovým zapojením, skládajícím se z pomocné platinové elektrody a z referentní argentschloridové elektrody (3 M KCl), ke které jsou vztaženy hodnoty potenciálů. Pracovní uhlíková elektroda ze skelného uhlíku (GCPE) byla připravena z 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku (velikost částic 10 – 20  $\mu\text{m}$ , Alfa Aesar, Německo) a ze 100  $\mu\text{l}$  minerálního oleje (Fluka, Švýcarsko). Takto připravená pasta byla naplněna do teflonového těla s ocelovým pístem [54]. Vnitřní průměr teflonového těla je 3 mm. Obnova povrchu byla prováděna pomocí filtračního papíru navlhčeného vodou. Pro ověřovací měření byla jako pracovní elektroda použita elektroda ze skelného uhlíku (průměr 2 mm, Metrohm, Švýcarsko), která byla zapojena také v tříelektrodovém zapojení se stejnou referentní i pomocnou elektrodou. DC voltamogramy byly měřeny při rychlosti skenu 100  $\text{mV s}^{-1}$ .

Měrný systém pro průtokovou injekční analýzu (FIA) se skládal z pumpy HPP 5001 a z amperometrického detektoru ADLC 2 (oba Laboratorní přístroje Praha, ČR), doplněných spektrofotometrickým detektorem Sapphire (ECOM, ČR). Amperometrický detektor využíval stejnou sestavu elektrod jako v případě DC voltametrie. Pracovní elektroda byla umístěna v uspořádání „wall-jet“ (obr 3.2) v kontrolované vzdálenosti proti výstupní kapiláře [30]. Měření byla prováděna při průtokové rychlosti 1  $\text{ml min}^{-1}$  a při použití 20  $\mu\text{l}$  dávkovací smyčky.

Při přípravě elektrody pro DC voltametrii byla elektroda zapojena do uspořádání simulující zapojení wall-jet a vystavena průtokové rychlosti 1  $\text{ml min}^{-1}$ , v tomto případě byla použita pumpa HPP 4001 (Laboratorní přístroje Praha, ČR).





Obr. 3.2 Schéma zapojení elektrod v uspořádání wall-jet

### 3.1.3. Pracovní postupy

#### 3.1.3.1. *Určování šumu měření DC voltametrie*

Při vyhodnocení šumu byl zjišťován posun mezi nejvyšším a nejnižším bodem základní linie z intervalu potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu od 200 do 400 mV.

Není-li uvedeno jinak, byla všechna měření prováděna pětkrát.

## **3.2. Tubulární coulometrický detektor plněný mikročásticemi skelného uhlíku**

### **3.2.1. Použité chemikálie**

Při vývoji coulometrického detektoru byl jako modelový analyt pro testování detektoru použit hexakynoželeznatan draselný (Lachema, Brno, ČR) ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ). Jako nosný roztok pro tento analyt byl použit  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  síran sodný (Lachema, Brno, ČR). Funkčnost detektoru byla ověřována na organických látkách: hydrochinonu (Lachema, Brno, ČR) a askorbové kyselině (Ph Eur, Lach-Ner, Neratovice, ČR). Pro tyto látky byl jako nosný roztok použit B-R pufr (připravený ze stejných látek jako v kapitole 3.1.1.) o pH 2 a 4 [55] pro hydrochinon, respektive o pH 7 [56] pro askorbovou kyselinu.

Detektor byl plněn mikrokuličkami skelného uhlíku (velikost částic 10 – 20  $\mu\text{m}$ , Alfa Aesar, Německo). Při plnění detektoru bylo použito rozpouštědlo nitromethan (Polskie odczynniki chemiczne (POCH), Gliwice, Polsko), které bylo následně vymýváno methanolem (p.a.  $\geq 99,9 \%$ , Merck, Německo).

Všechny látky bez uvedené čistoty vyrobené společnostmi Lachema a POCH jsou v čistotě p.a. Všechny vodné roztoky byly připraveny z deionizované vody (Millipore Q-plus systém, Millipore, USA).

### **3.2.2. Přístrojové vybavení**

Mikrosnímky částic skelného uhlíku byly pořízeny skenovacím elektronovým mikroskopem JEOL 6380 LV (Jeol Ltd., Japonsko).

Pro měření odporu mezi elektrodami byl použit digitální multimetr M-4650CR (Metex, Korea).

Pro úpravu kapilár potřebných pro konstrukci detektoru byl použit přístroj Cheminert flanging tool 220 Vac (VICI Valco instruments, USA).

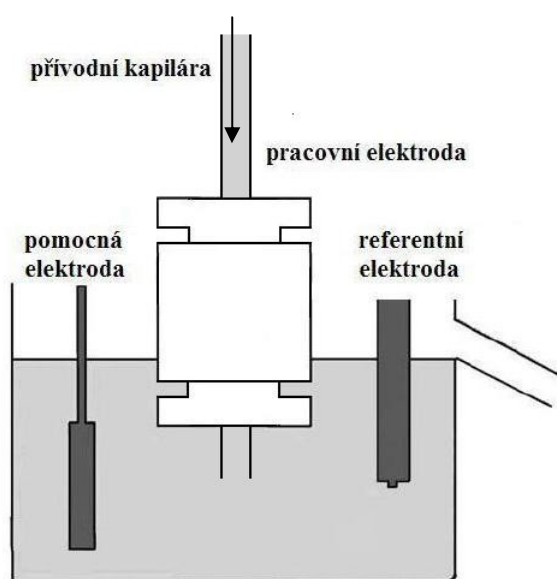
Pro měření pH při přípravě pufrů byl používán pH metr 3510 (JenWay, Velká Británie).

Metoda FIA byla vybrána i pro testování coulometrického detektoru. Bylo použito obdobné přístrojové uspořádání jako v případě zkoumání změn povrchu GCPE vlivem methanolu, tedy systém složený z pumpy HPP 5001 a z detektoru ADLC 2 (oba

Laboratorní přístroje Praha, Česká republika), doplněných spektrofotometrickým detektorem Sapphire (ECOM, Česká republika). Coulometrický detektor pracoval v tří-elektrodovém zapojení (obr 3.3) s pomocnou platinovou elektrodou a s referentní argentochloridovou elektrodou (3 M KCl), ke které jsou vztaženy hodnoty potenciálů. UV detektor byl zapojen před coulometrickým detektorem a způsoboval výraznou deformaci elektrochemických píků, proto byl pro následnou práci a vývoj coulometrického detektoru odpojen.

Pro plnění coulometrického detektoru byla použita pumpa HPP 4001 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika).

Není-li uvedeno jinak, byla všechna měření prováděna pětkrát.



Obr. 3.3 Schéma zapojení coulometrického detektoru

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1. Změny povrchové struktury pastové elektrody z mikrokuliček skelného uhlíku vyvolané působením roztoku methanolu

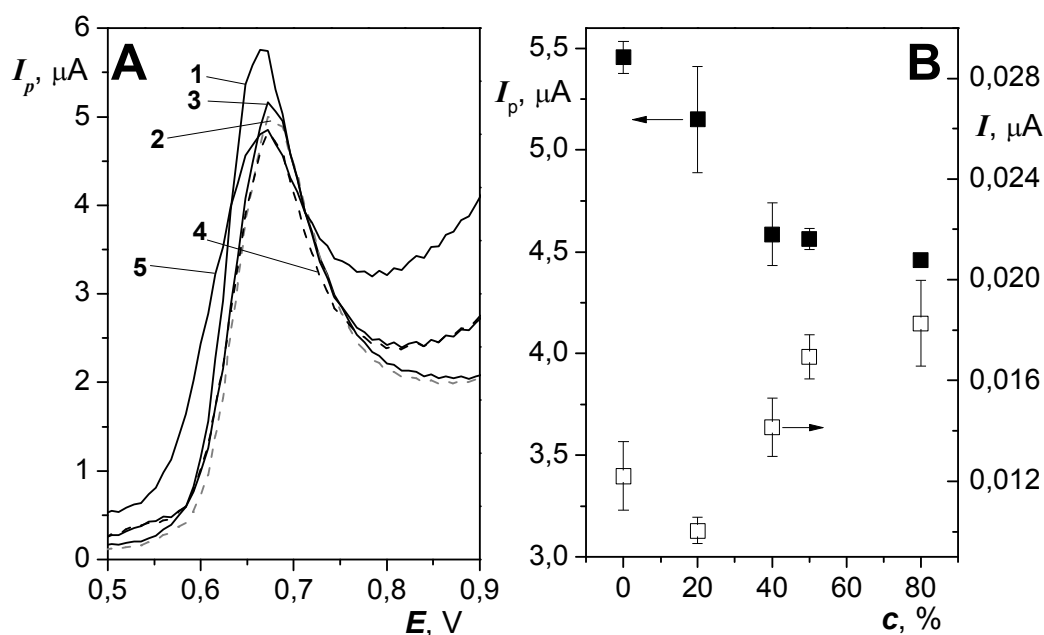
Uhlíková pasta je nejběžněji připravována z grafitu, její nevýhodou je však nízká odolnost proti organickým rozpouštědlům, která se běžně používají jako součást mobilní fáze HPLC. Pokud se však pro přípravu pasty namísto grafitu použijí sférické mikročástice skelného uhlíku, odolává pasta i vyšším koncentracím roztoku methanolu a nedochází k jejímu rozkladu. GCPE lze použít v prostředích roztoku methanolu s koncentrací až do 80 %. V této kapitole bude diskutován vliv vodných roztoků methanolu na povrch uhlíkové pasty a s tím spojené jevy.

#### 4.1.1. Voltametrické chování

Změny struktury povrchu uhlíkové pasty vyvolané působením methanolu mají za následek i změnu v elektrochemické odezvě těchto elektrod. Pro pozorování těchto změn byla použita DC voltametrie. Tato metoda byla upřednostněna před metodou FIA, protože vykazovala větší reprodukovatelnost výsledků a menší časovou náročnost na provedení měření.

##### 4.1.1.1. *Vliv methanolu přítomného v měrné cele na odezvu GCPE*

Nejprve bylo vyzkoušeno měření s roztokem methanolu přímo v měrné cele, protože toto uspořádání by bylo experimentálně i časově nejméně náročné. Byla změřena závislost odezvy GCPE na koncentraci methanolu v základním elektrolytu (obr 4.1). Bohužel toto uspořádání není vhodné pro přesný popis a studium vyvolaných změn, jelikož není možné odlišit vliv změn povrchu elektrody od vlivu změn složení základního elektrolytu.



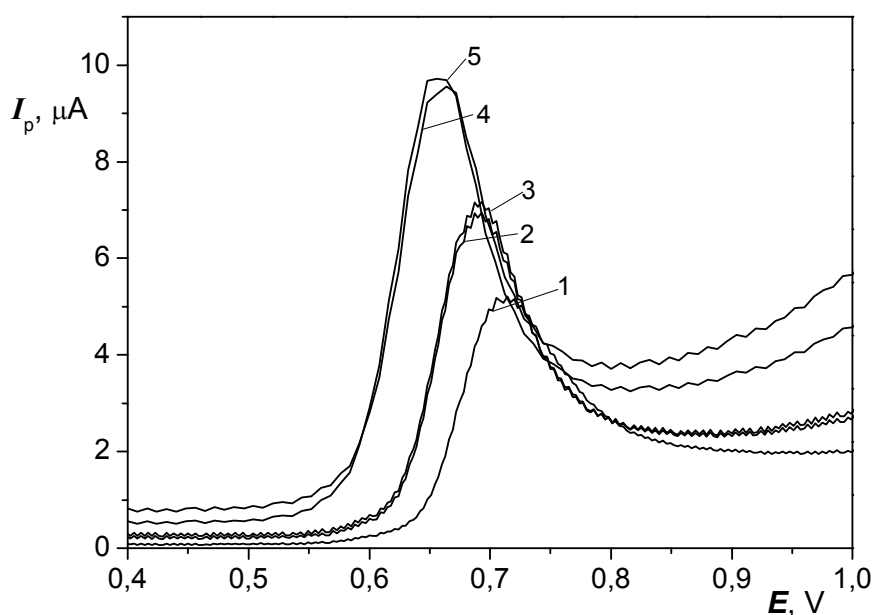
Obr. 4.1 Vliv methanolu přítomného v měrné cele na změny signálu syringové kyseliny ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ); ukázky tvaru píku (A) pro 0% (1), 20% (2), 40% (3), 50% (4) a 80% (5) koncentraci methanolu a závislost změny výšky píku (plné symboly) a šumu (prázdné symboly) na koncentraci roztoku methanolu v měrné cele (B), základní elektrolyt složen z B-R pufru o pH 3 a methanolu o různé koncentraci.

#### 4.1.1.2. Porovnání působení methanolu vsádkovou a průtokovou metodou

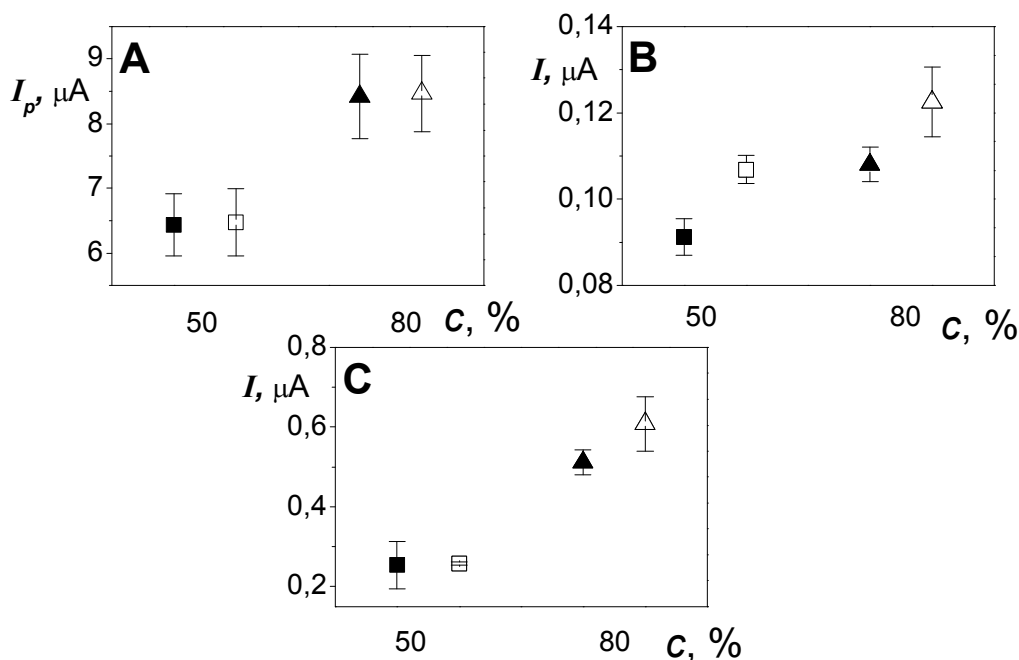
Protože, jak bylo prokázáno, měření s roztokem methanolu přímo v měrné nádobce na DC voltametii není vhodné pro pozorování všech změn vyvolaných působením methanolu, musel být použit experimentálně náročnější postup. Elektroda byla před měřením vzorku nejprve vystavena působení vodného roztoku methanolu a po této úpravě přesunuta do roztoku vzorku ve vodném elektrolytu (B-R pufr), kde probíhalo samotné měření. Elektroda byla vystavena toku methanolu a byla zapojena do uspořádání simulujícího wall-jet, aby bylo dosaženo podmínek, které se co nejvíce podobají zapojení tohoto detektoru při měřeních v průtokových metodách. Výsledky byly porovnávány s elektrodou s čerstvě obnoveným povrchem.

Toto uspořádání nemohlo být dodrženo při mikroskopické studii a při sledování dlouhodobých změn uhlíkové pasty, při nichž byl tento postup znemožněn

experimentální náročností. Bylo proto ověřeno, zda umístění elektrody v míchaném roztoku methanolu vyvolává obdobné změny na povrch uhlíkové pastové elektrody jako uspořádání průtokové. Srovnání mezi vsádkovým a průtokovým uspořádáním bylo provedeno pro 50% a 80% roztoky methanolu, protože při těchto koncentracích dochází k nejvýraznějším změnám oproti čerstvě obnovené elektrodě (obr. 4.2). Statisticky zpracované výsledky pro výšku píku, šum a pozadí jsou uvedeny na obrázku 4.3. Z grafů je patrné, že změny ve voltamogramech jsou v obou případech takřka totožné, s výjimkou výraznějšího nárůstu šumu v případě působení methanolu v průtoku. Bylo tedy prokázáno, že není výrazný rozdíl ve výsledných voltamogramech mezi průtokovým a vsádkovým uspořádáním, a že je možné pro zjednodušenou práci při mikroskopické studii povrchu a při sledování dlouhodobé stability elektrody použít vsádkové uspořádání s míchaným roztokem.



Obr. 4.2 Porovnání voltamogramů syringové kyseliny ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) pořázených po vystavení elektrody působení roztoku methanolu při vsádkovém a průtokovém uspořádání; elektroda s čerstvě obnoveným povrchem (1), elektroda vystavená toku 50% (2) a 80% (4) roztoku methanolu a elektroda vystavená působení 50% (3) a 80% (5) míchaného roztoku, základní elektrolyt B-R pufru o pH 3.



Obr. 4.3 Porovnání vsádkového (plné symboly) a průtokového uspořádání (prázdné symboly); srovnání změn signálu (A), šumu (B) a pozadí (C) v 50% (symbol čtverce) a 80% (symbol trojúhelníku) methanolu, měření syringové kyseliny ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v B-R pufru o pH 3.

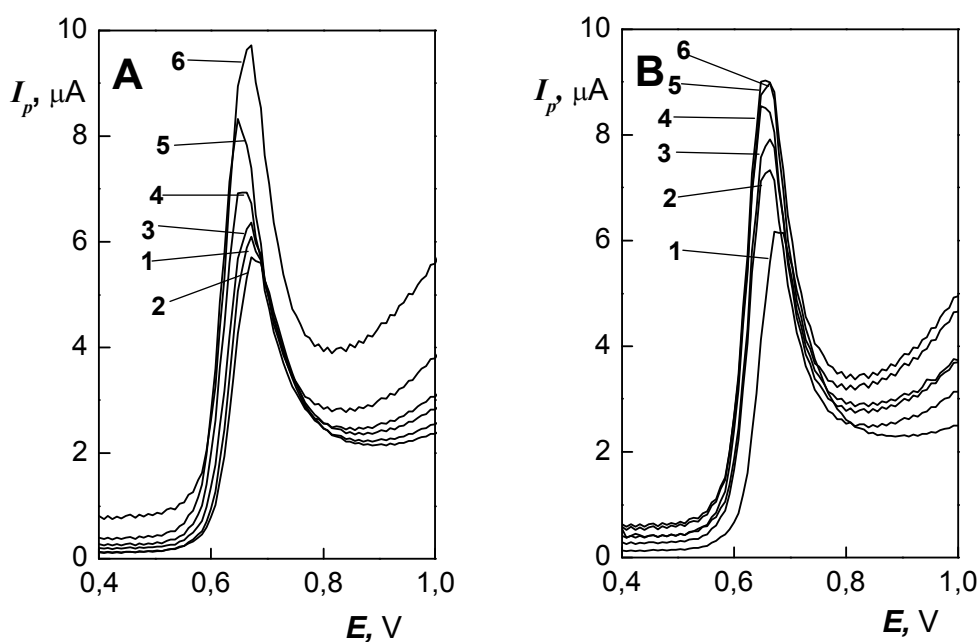
#### 4.1.1.3. Studium změn odezvy signálu vyvolaných působením methanolu na povrch GCPE

V další práci byl zkoumán rozsahu povrchových změn elektrody z hlediska vlivu koncentrace methanolu a vlivu doby, po kterou byla elektroda vystavena působení 80% methanolu (obr. 4.4). Na obrázku 4.5 jsou znázorněny statisticky zpracované hodnoty pro výšku píku a šum měření pro obě zkoumané závislosti.

Z experimentálních dat vyplývá, že působením roztoku methanolu o nízkých koncentracích, pod 50 % zastoupení methanolu, nedochází k významnému ovlivnění voltamogramů. Takto koncentrované roztoky zřejmě nejsou dostatečně koncentrované, aby rozpouštěním minerálního oleje narušily homogenitu pasty. Tento závěr potvrzují i práce popisující bezproblémové měření s uhlíkovými pastovými elektrodami z grafitu v prostředích s nízkým obsahem methanolu, a to jak ve vsádkovém [57], tak v průtokovém uspořádání [58]. Při vyšších koncentracích dochází k rychlým změnám

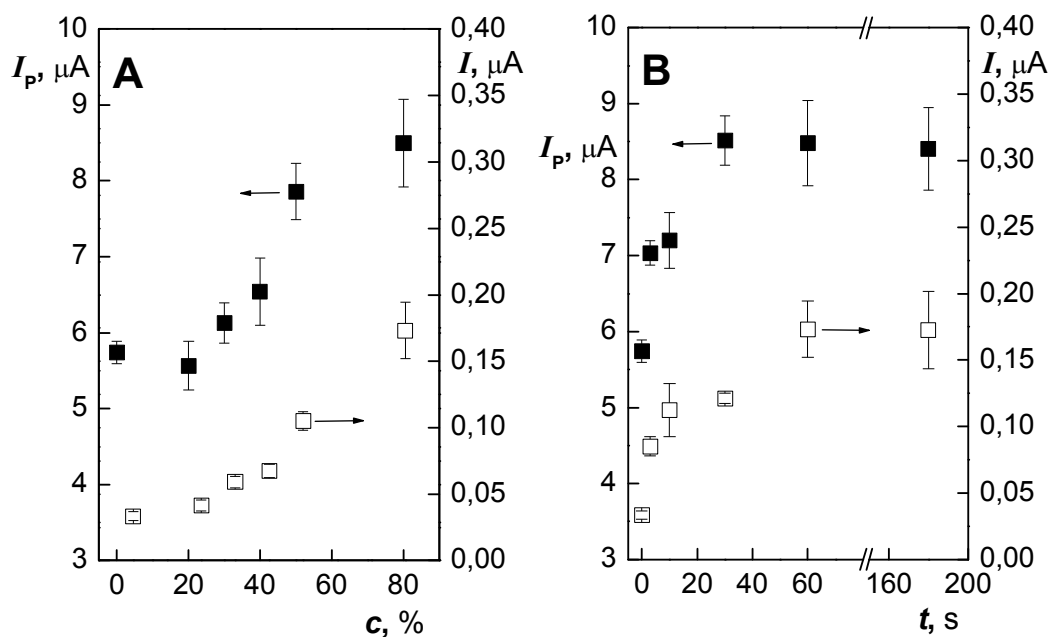
povrchu elektrody, což dokládá ustálení změn voltamogramů již po 30 sekundách. Rychlé ustálení signálu lze očekávat i v průtokových metodách. Tato fakta deklarují možnost použití GCPE v průtokových metodách ve vodných roztocích methanolu, což dokazují i na toto téma publikované práce [26, 29, 30].

Z naměřených voltamogramů pro obě uspořádání použita pro vyvolání změn na povrchu elektrody působením roztoku methanolu jsou patrné vyvolané změny: posun píku k méně pozitivním hodnotám a nárůst výšky píku, pozadí a šumu. Tyto změny by mohly být způsobeny vymytím části pastovací kapaliny pokrývající mikročástice skelného uhlíku, a tedy odkrytím větší plochy uhlíkových částic [59]. Další možnou teorií je nárůst aktivního povrchu elektrody jejím zhrubnutím [60] – povrch elektrody vystavený methanolu by se mohl zvlnit a stát členitějším. Bohužel pomocí DC voltametrie není možné rozhodnout, která teorie se ve skutečnosti uplatňuje při změnách povrchu elektrody, popřípadě jejich příspěvek k těmto změnám.



Obr. 4.4 DC voltamogramy syringové kyseliny ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ); měřeno v B-R pufru při pH 3 na GCPE po vystavení elektrody toku roztoku methanolu (A) obsahujícím 0 (1), 20 (2), 30 (3), 40 (4), 50 (5), 80 (6) % methanolu po dobu 60 s; (B) po 0 (1), 3 (2), 10 (3), 30 (4), 60 (5), 180 (6) s v 80% methanolu.



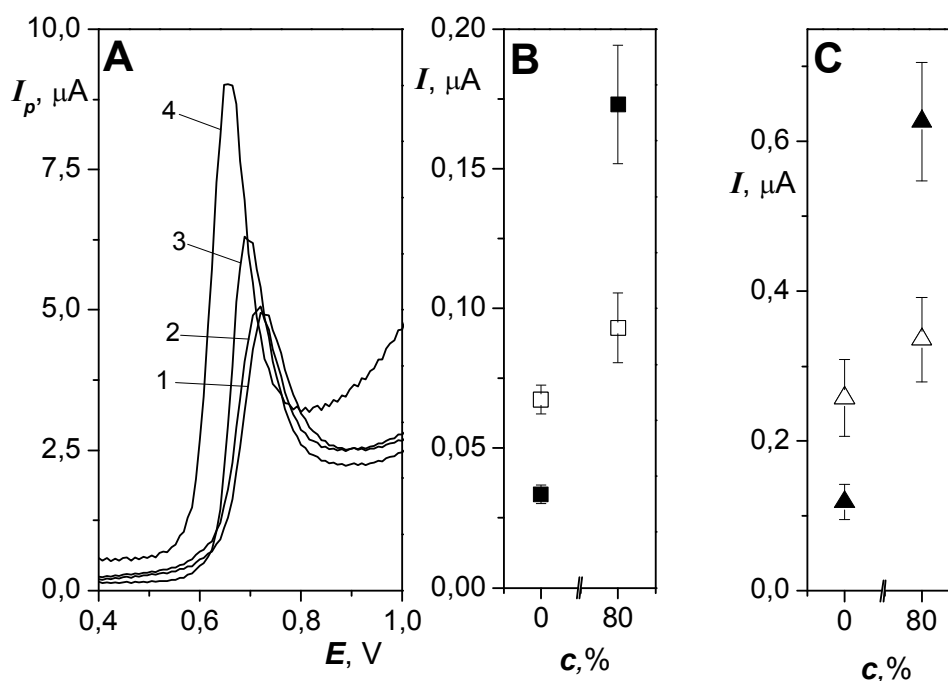


Obr. 4.5 Závíslost výšky anodického DCV píku (plné symboly) a šumu měření (prázdné symboly) na koncentraci roztoku methanolu působícího na povrch elektrody v průtokovém uspořádání po dobu 60 s (A) a na době expozice povrchu elektrody 80% roztokem methanolu (B); stanovení syringové kyseliny o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $I^{-1}$ , měřeno v B-R pufru o pH 3 na GCPE.

#### 4.1.1.4. Elektroda ze skelného uhlíku

Veškeré změny odezvy elektrody jsou připisovány vlivu methanolu na pastovací kapalinu, která je v tomto organickém rozpouštědle na rozdíl od uhlíkové složky rozpustná. Nelze však s určitostí vyloučit, že všechny popsání změny v odezvě elektrody jsou způsobeny právě vlivem methanolu na pastovací kapalinu, některé změny by mohly být způsobeny i změnami uhlíkové složky elektrody, například adsorpcí methanolu na povrchu uhlíku. Pokud by byla tato domněnka pravdivá, docházelo by k obdobným změnám s pevnou elektrodou ze skelného uhlíku. Elektroda ze skelného uhlíku byla vystavena působení míchaného 80% roztoku methanolu obdobně jako GCPE a získaný voltamogram byl porovnán s voltamogramem pořízeným s elektrodou s čerstvě vyleštěným povrchem. Obdržené výsledky chování elektrody ze skelného uhlíku a jejich porovnání s chováním GCPE jsou uvedeny na obrázku 4.6. Je

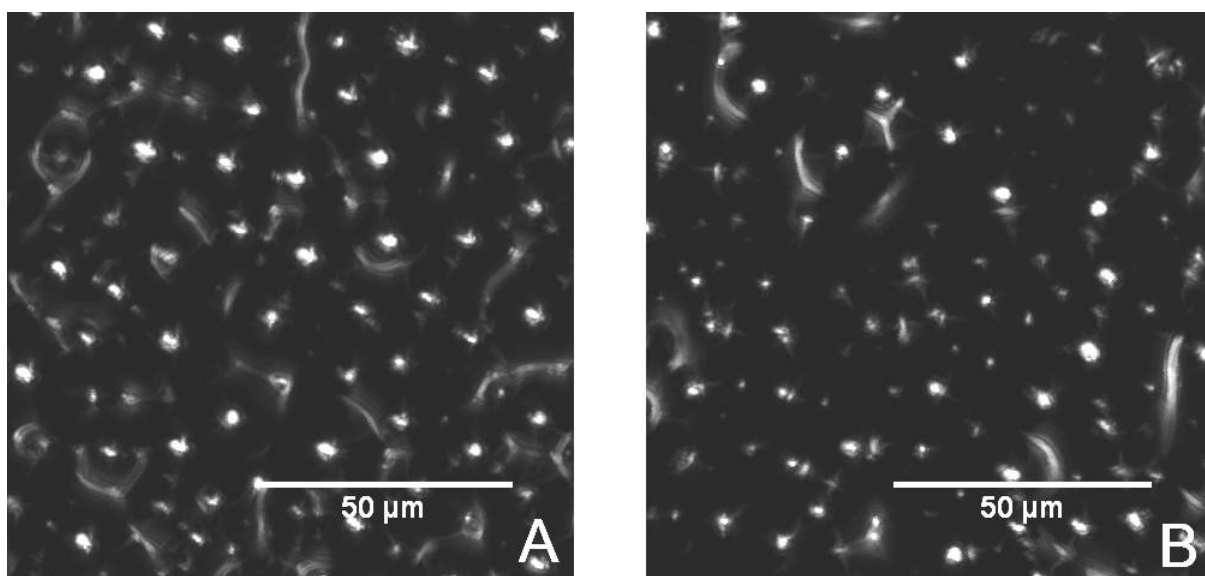
vidět, že působením methanolu na elektrodu ze skelného uhlíku nedochází ke stejným změnám, které methanol vyvolává u GCPE. V případě elektrody ze skelného uhlíku nedochází k významnému nárůstu signálu, šumu a pozadí a ani k výraznému posunu píku k méně pozitivním hodnotám. Změny v odezvě elektrody jsou tedy skutečně způsobeny změnou povrchu GCPE vyvolanou působením methanolu na pastovací kapalinu.



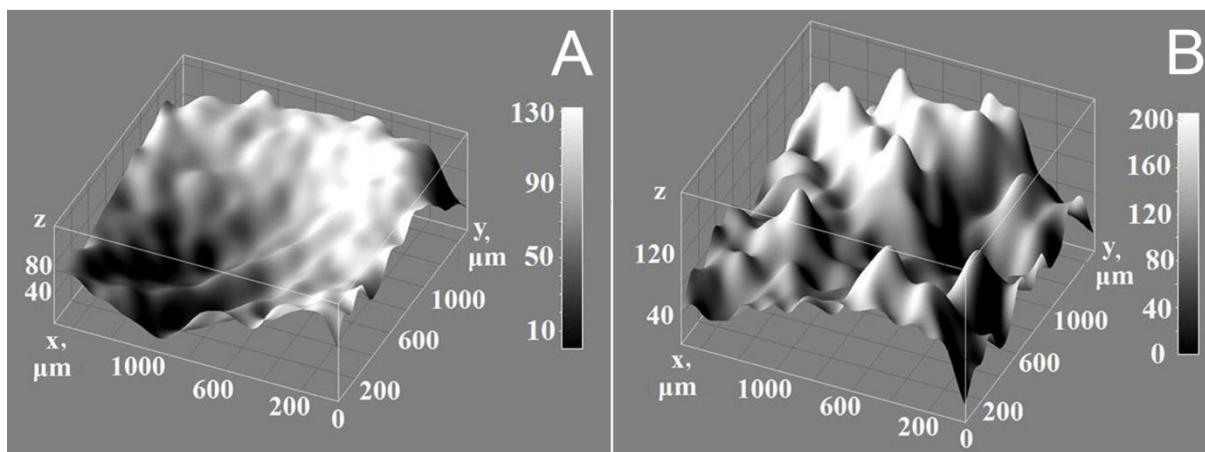
Obr. 4.6 Porovnání vlivu methanolu na elektrodu ze skelného uhlíku a GCPE; (A) Charakteristické voltamogramy elektrody ze skelného uhlíku s čerstvě vyleštěným povrchem (1), po vystavení působení 80% methanolu (2) a GCPE s čerstvě obnoveným povrchem (3) a vystavené 80% methanolu (4), (B) závislosti šumu na koncentraci roztoku methanolu působícího na elektrodu ze skelného uhlíku (prázdné symboly) a GCPE (plné symboly) a graf (C) závislost pozadí na koncentraci roztoku methanolu působícího na elektrodu ze skelného uhlíku (prázdné symboly) a GCPE (plné symboly), stanovení syringové kyseliny o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , měřeno v B-R pufru o pH 3 na GCPE.

#### 4.1.2. Mikroskopická studie

Konfokální mikroskopie byla použita pro studii povrchu GCPE a jeho změn vyvolávaných působením roztoku methanolu. Mikroskopem byl pořízen snímek povrchu čerstvě obnovené elektrody, tato elektroda byla pak vystavena míchanému roztoku 80% methanolu a následně byl pořízen druhý snímek povrchu (obr 4.7). Z obou snímků je patrné, že předpoklad vymývání pastovací kapaliny z povrchu uhlíkových mikročástic nebyl potvrzen. Tento jev by vedl k nárůstu odhalené plochy uhlíkových mikročástic. Na obou snímcích je však průměr odhaleného povrchu takřka totožný a zhruba roven 5  $\mu\text{m}$ . Oba pořízené snímky se však výrazně lišily, a to v počtu řezů, které byly potřebné při jejich pořízení. Snímek elektrody vystavené působení 80% methanolu byl složen z většího množství řezů, což poukazovalo na větší hloubku snímaného povrchu. Povrch elektrody tedy zřejmě působením methanolu zhrubl a stal se výrazně členitějším. K prokázání této teorie byly zhotoveny stereometrické projekce obou povrchů (obr 4.8), ze kterých je hrubnutí povrchu dobře patrné. Čerstvě obnovená elektroda má povrch takřka planární, ten ale působením roztoku methanolu hrubne na povrch, který je mnohem členitější. Výsledkem je tedy výrazný nárůst celkové aktivní plochy tohoto povrchu, které má za následek výše popsané změny v DC voltamogramech.



Obr.4.7 Mikrosnímek povrchu uhlíkové pastové elektrody ze skelného uhlíku; čerstvě obnovený povrch (A) a povrch vystavený působení roztoku 80% methanolu po dobu 60 sekund (B).



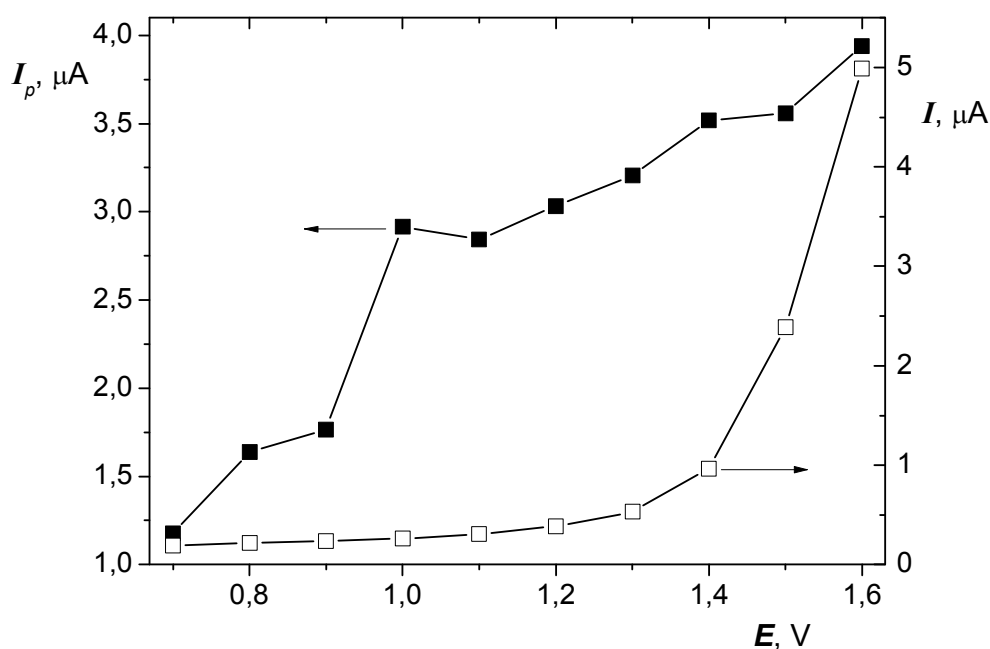
Obr. 4.8 **Stereometrická projekce povrchu uhlíkové pastové elektrody ze skelného uhlíku**; čerstvě obnovený povrch (A) a povrch vystavený působení roztoku 80% methanolu po dobu 60 sekund (B).

#### 4.1.3. Detekce v průtokových metodách

Závěry získané v předchozích kapitolách byly ověřeny při detekci v průtokových metodách, konkrétně byla zvolena metoda FIA, GCPE byla použita jako pracovní elektroda elektrochemického detektoru zapojená do uspořádání wall-jet.

##### 4.1.3.1. *Hydrodynamický voltamogram*

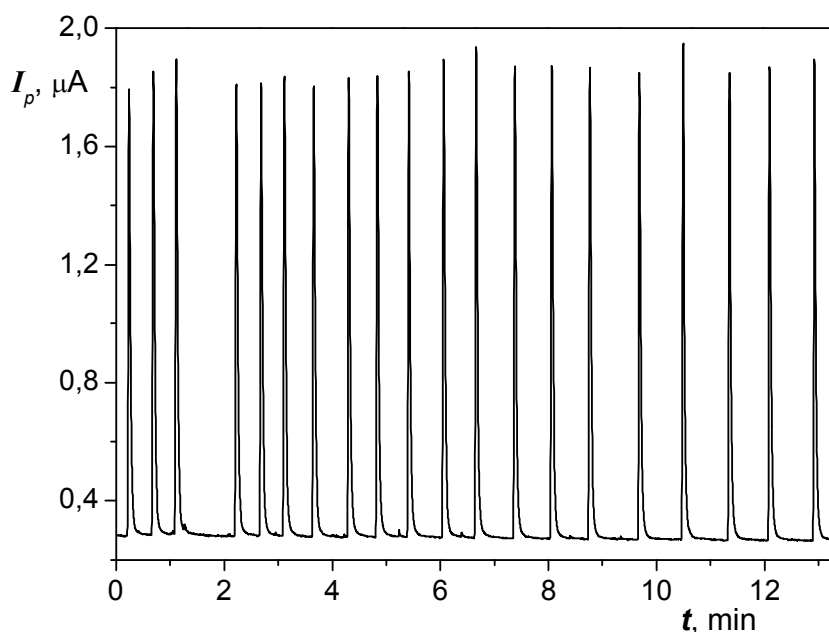
Pro získání dostatečné odezvy je nutné zvolit vhodný potenciál pracovní elektrody. Pro určení tohoto potenciálu byl při průtokové rychlosti  $1 \text{ ml min}^{-1}$  proměřen hydrodynamický voltamogram syringové kyseliny o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  (obr. 4.9), z něhož je patrné, že syringová kyselina se oxidaže ve dvou stupních. Z hydrodynamického voltamogramu dále vyplývá, že optimální vkládaný potenciál je  $+1,0 \text{ V}$ , tato hodnota byla použita pro všechna následující měření.



Obr. 4.9 Hydrodynamický voltamogram syringové kyseliny ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ); výška píků (plné symboly) a proud pozadí (prázdné symboly), měřeno v B-R pufru o pH 3, průtoková rychlost  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , objem dávkování  $20 \mu\text{l}$  a detekční potenciál  $+1,0 \text{ V}$ .

#### 4.1.3.2. Stálost signálu

Po určení pracovních podmínek stanovení syringové kyseliny bylo ověřeno, zdali je odezva detekce při stanovení tohoto analytu v čase stálá. Za tímto účelem bylo provedeno 20 po sobě jdoucích nástřiků vzorku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , záznam měření stability signálu je uveden na obrázku 4.10. Statisticky zpracované výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.1. Z výsledků je patrná dostatečná robustnost elektrody při měření kyseliny syringové, látka nemá pasivační účinek na GCPE, a je tedy možné při kontinuálním měření provést minimálně 20 nástřiků vzorku bez nutnosti obnovování povrchu elektrody.



Obr. 4.10 **Záznam měření stálosti odezvy GCPE;** dvacetkrát nadávkovaná syringová kyselina ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v B-R pufru o pH 3, vkládaný potenciál + 1,0 V, průtoková rychlost  $1 \text{ ml min}^{-1}$  a objem dávkování  $20 \mu\text{l}$ .

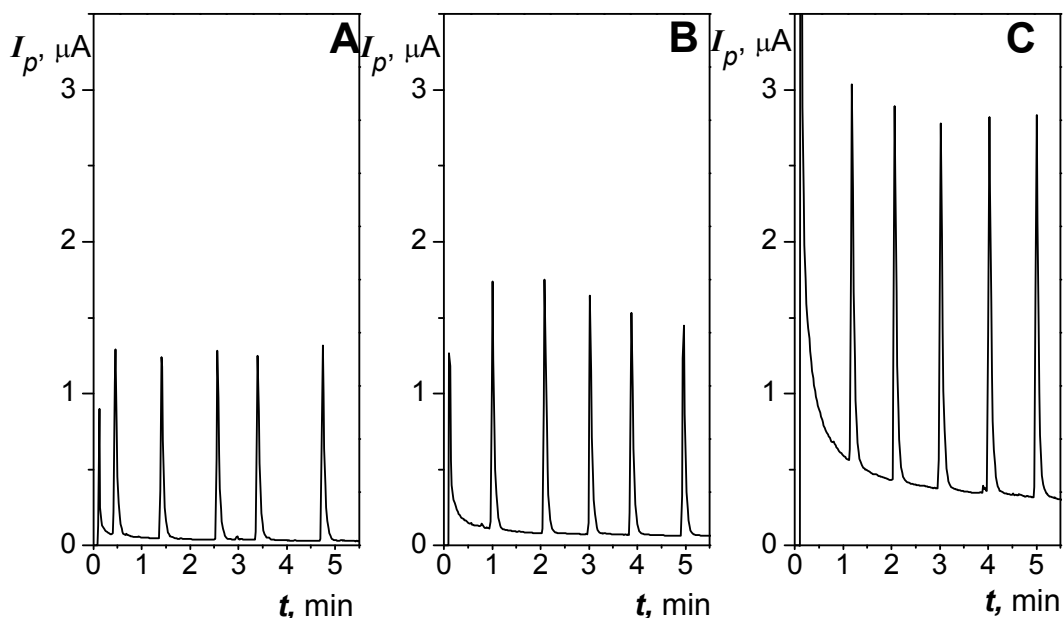
Tabulka 4.1 Stálost signálu syringové kyseliny na GCPE; měřeno dvacet po sobě jdoucích nástríků.

	$S$	$I_p$
	nA s	nA
	$4430 \pm 159$	$1578 \pm 44$
RSD (%)	3,6	2,8

#### 4.1.3.3. *Ověření změn v chování GCPE*

Během ověření změn v chování elektrody ovlivněné působením roztoku methanolu byla elektroda vystavena po dobu 60 sekund průtoku roztoku methanolu o koncentraci 20 % a 80 %, pro porovnání posloužila elektroda s čerstvě obnoveným povrchem. Pořízené záznamy, obsahující ustalování základní linie, jsou znázorněny na obrázku 4.11 a statisticky zpracované výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.2.

Výsledky jsou v dobré shodě s voltametrickým měřením, i v případě měření v průtokovém uspořádání dochází i k nárůstu výšky píku a pozadí. Zajímavostí je delší doba potřebná k ustálení základní linie.



Obr. 4.11 FIA záznamy získané na obnoveném povrchu elektrody (A), po působení 20% methanolu v průtoku po 60 s (B) a 80% methanolu po 60 s (C); syringová kyselina ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v B-R pufru o pH 3, detekční potenciál + 1,0 V, průtoková rychlost  $1 \text{ ml min}^{-1}$  a objem dávkování  $20 \text{ } \mu\text{l}$ , měřeno na GCPE.

Tabulka 4.2 Statisticky zpracované výsledky výšky píků a proudového pozadí syringové kyseliny; měřeno na GCPE vystavené toku různě koncentrovaného roztoku methanolu.

	$I_p$ $\mu\text{A}$	$I$ (pozadí) $\text{nA}$
čerstvě obnovený		
povrch	$1,31 \pm 0,11$	$36 \pm 11$
20% methanol	$1,58 \pm 0,14$	$80 \pm 20$
80% methanol	$2,46 \pm 0,21$	$297 \pm 65$

#### 4.1.4. Měření hustoty

Minerální olej je bezesporu rozpustný v methanolu, stejně jako ostatní pastovací kapaliny s vhodnými elektrochemickými vlastnostmi. GCPE však odolávají methanolu i přes to, že obsahují minerální olej, který by měl být rozpuštěn a vymyt z povrchu pasty, což se však na snímcích pořízených konfokálním mikroskopem neprojevilo. Je možné, že pastovací kapalina by mohla být kontinuálně vymývána a nahrazována z hloubi pasty. To by vedlo k ustálení signálu v průtokových metodách, ale zároveň by docházelo ke změně složení pasty s časem. Uhlík a pastovací kapalina se poměrně výrazně liší v hustotě, pokud by tedy docházelo ke změně složení pasty, mělo by dojít i ke změně její hustoty.

Hustota pasty byla stanovena pomocí tenkostěnné skleněné trubičky o známé délce. Objem trubičky byl určen z hmotnosti destilované vody, kterou byla kapilára naplněna. Ze znalosti objemu kapiláry a hmotnosti této kapiláry naplněné uhlíkovou pastou byla určena hustota měřené pasty.

Hustota uhlíkové pasty byla změřena před a po vystavení pasty několikahodinovému působení míchaného roztoku methanolu. Statisticky zpracované výsledky měření hustoty jsou uvedeny v tabulce 4.3. Došlo k mírnému nárůstu hustoty pasty, což potvrzuje předpoklad, že stejné pokrytí mikročástic skelného uhlíku, které bylo prokázáno při mikroskopické studii, je dáno dynamickým procesem, tedy že pasta vymytá z povrchu pasty je kontinuálně doplňována. Elektroda je však proti tomuto ději dostatečně robustní a nedochází tedy ke změnám v její odezvě.

Tabulka 4.3 Změna hustoty uhlíkové pasty po dlouhodobé expozici v míchaném roztoku 80% methanolu.

$t$	$\rho$
hod	$\text{g cm}^{-3}$
0	$1,148 \pm 0,013$
7	$1,166 \pm 0,012$
14	$1,179 \pm 0,057$



## **4.2. Tubulární coulometrický detektor plněný mikročásticemi skelného uhlíku**

### **4.2.1. Základní konstrukce coulometrického detektoru**

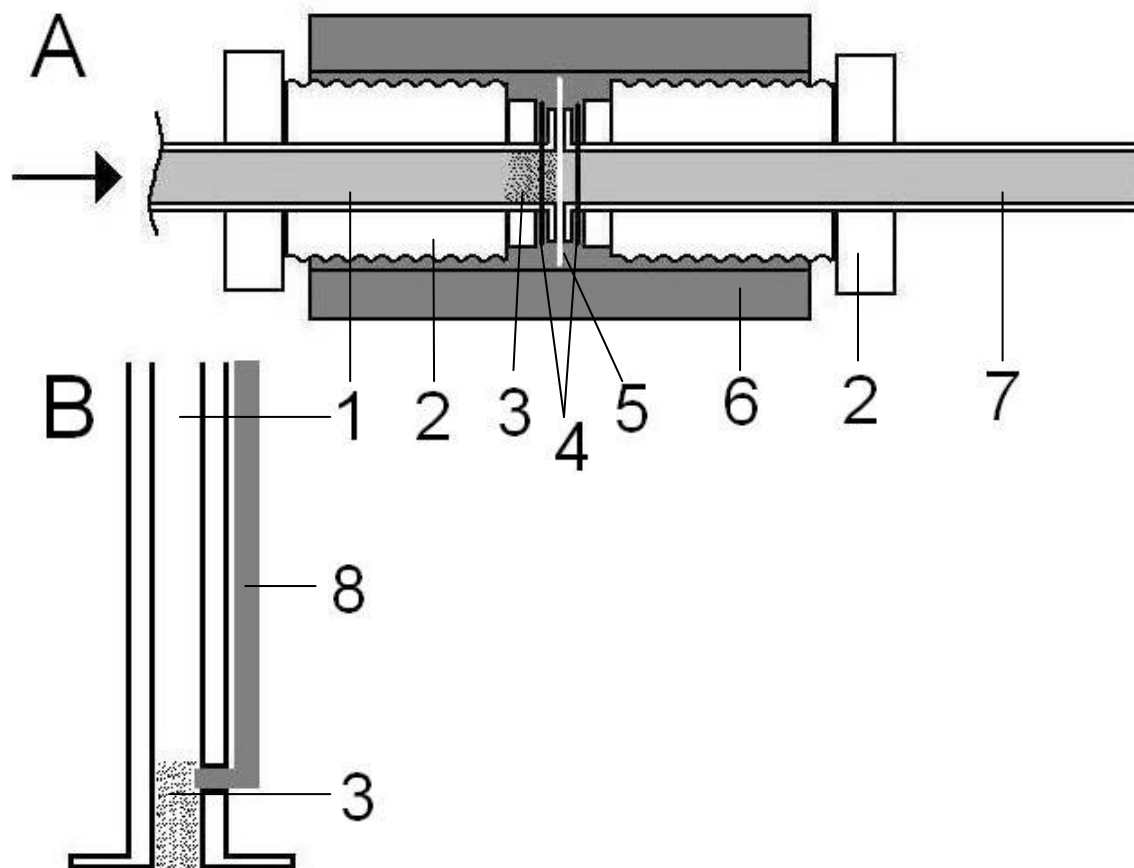
Hlavním cílem této práce bylo zkonstruovat jednoduchý, levný, ale i dostatečně citlivý coulometrický detektor. Pro konstrukci byl použit běžný spojovací materiál (obr. 4.12 A). Základem coulometrického detektoru je přívodní kapilára, která je plněna částicemi skelného uhlíku. Do této kapiláry je jehlou zhotoven otvor, do kterého je zaveden kontakt pomocí platinového drátu. Vstupní kapilára je ukončena obrubou a spojeny pomocí šroubů (1/8“, IDEX, USA) a spojky, mezi obě kapiláry je vložen vhodný filtr. Výhodou konstrukce je tedy snadná dostupnost potřebného materiálu i jednoduchý postup výroby.

Aby obě kapiláry při spojení dostatečně těsnily, je třeba jejich konce opatřit obrubou, tedy teplotně roztáhnout a zploštit (výsledný tvar kapiláry je znázorněn na obr. 4.12 B). Materiál musí být odolný vůči tlaku, který vzniká při vedení nosného roztoku a zároveň dostatečně měkký aby skrz jeho stěnu bylo možné zavést kontakt. Těmto potřebám nejlépe vyhovují nízkotlaké teflonové kapiláry (PTFE, 1/16“ × 0,50 mm ID, VICI, USA). Teflonové kapiláry se dají snadno upravovat pro potřeby konstrukce detektoru, ale odolávají tlaku jen do 5 MPa. Při snaze o odstranění tohoto nedostatku byly testovány vysokotlaké kapiláry z materiálu PEEK, tento materiál byl však příliš odolný a znemožňoval roztáhnutí konce kapiláry a zavedení kontaktu. Pro konstrukci detektoru byly tedy nadále používány nízkotlaké teflonové kapiláry.

Vedení signálu od uhlíkové vrstvy k vyhodnocovacímu zařízení je zajištěno platinovým drátem, který je zaveden do vnitřního prostoru kapiláry skrz její stěnu. Do stěny kapiláry se za pomoci jehly vyvrtá otvor, který odpovídá průměru platinového drátu, čímž je omezeno prosakování nosného roztoku a vzorku skrz vymodelovaný otvor. Celý kontakt je ještě potažen vrstvou polystyrenu (obr. 4.12 B). I přes tuto úpravu dochází časem k protékání nosného roztoku v místě kontaktu, čímž je omezena životnost detektoru.

Jako filtr byla nejprve testována filtrační membrána z termoplastického flouropolymeru (PDVF), která byla ale málo porézní a docházelo k jejímu častému ucpávání. Proto byla vyzkoušena polymerní tkanina z PUR (Elmarco, ČR), při práci s ní

již nedocházelo k ucpávání filtru, ale bohužel je rozpustná v organických rozpouštědlech, která jsou používána při plnění detektoru. Jako další možný filtr byl otestován filtrační papír, který se v používaných rozpouštědlech nerozpouští a při práci s uhlíkovými mikročásticemi nedocházelo k jeho ucpávání. Filtrační papír je tedy vhodný pro práci s coulometrickým detektorem.



Obr. 4.12. Schéma základní konstrukce detektoru (A) a zapojení kontaktu do přívodní kapiláry (B); 1 – přívodní kapilára, 2 – spojovací šroub, 3 – uhlíková náplň mikrokuliček ze skelného uhlíku, 4 – ocelová podložka, 5 – filtr, 6 – spojka, 7 – výstupní kapilára, 8 – platinový kontakt.

#### 4.2.2. Konstrukční úpravy coulometrického detektoru

Všechny konstrukční úpravy byly testovány za použití vzorku hexakynoželezitanu draselného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , při průtokové rychlosti  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , objemu dávkovací cívky  $10 \text{ }\mu\text{l}$  a vkládaném potenciálu na pracovní elektrodu  $+ 0,5 \text{ V}$ . Hlavním předmětem zájmu konstrukčních úprav byl způsob zavedení kontaktu a rozměry výstupní kapiláry.

Konstrukce detektoru neumožňuje zavedení kontaktu v těsné blízkosti ústí přívodní kapiláry. Coulometrický detektor je pak nutné plnit vyšší vrstvou uhlíkových mikročástic, než je teoreticky potřebná hodnota. Delší zóna klade větší hydrodynamický odpor toku nosného roztoku.

Délka výstupní kapiláry může ovlivnit, vzhledem k uspořádání detektoru, efektivní vzdálenost mezi pracovní elektrodou a referentní či pomocnou elektrodou, a tedy i elektrický odpor mezi elektrodami, což by mohlo mít vliv na rozložení potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu a ovlivňovat stupeň konverze a průběh hydrodynamického voltamogramu [37].

Aby byly odstraněny vyjmenované nedostatky, byla zkrácena délka výstupní kapiláry a byl otestován jiný způsob zavedení kontaktu k pracovní elektrodě.

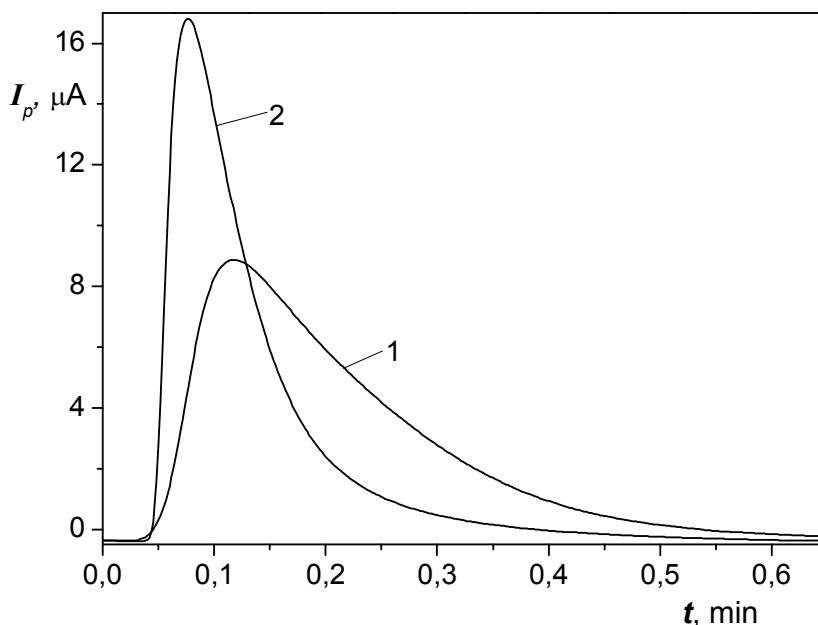
Další konstrukční úpravy nebyly prováděny, jelikož by vyžadovaly úplné přepracování základní konstrukce detektoru. Jediným zbylým a snadno upravitelným parametrem je délka a vnitřní průměr přívodní kapiláry.

Tento parametr nemá, jak je patrné z rovnice (2.4), vliv na stupeň konverze a neměl by mít tedy vliv ani na průběh hydrodynamického voltamogramu. Rozšíření kapiláry by vedlo jen k deformaci píků, naopak při zúžení by komplikovalo konstruování detektoru, proto nebylo přistoupeno k úpravám tohoto parametru detektoru.

##### 4.2.2.1. Úpravy vedení vzorku od dávkovací cívky k detektoru

Prvotní experiment pracoval s paralelním zapojením UV detektoru před coulometrický detektor, píky získané elektrochemickou detekcí byly však výrazně deformované. Pro omezení tohoto jevu byla zkrácena vzdálenost mezi detektory a byla zapojena i kapilára s menším vnitřním průměrem. Bohužel tyto změny neměly

dostatečný vliv na tvar získaných píků, došlo jen k nepatrnému zlepšení. Proto bylo vyzkoušeno i odpojení předřazeného UV detektoru. Následné píky byly vyšší a užší při zachování jejich plochy a nedocházelo již k tak výraznému rozmývání (obr. 4.13). Pro další měření již byl UV detektor ponechán odpojený.



Obr 4.13 **Porovnání tvaru píku po odpojení předřazeného UV detektoru;** záznam elektrochemického detektoru se zapojenou UV detekcí (1) a s odpojenou UV detekcí (2); měřeno pro vzorek hexakynoželezitan draselný ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v nosném roztoku síranu sodného  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ , při průtokové rychlosti  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , vkládaném potenciálu  $+0,5 \text{ V}$  a objemu dávkovací cívky  $10 \mu\text{l}$ .

#### 4.2.2.2. Změna rozměrů výstupní kapiláry

Základní konstrukce detektoru byla ve snaze o zlepšení tvaru píků modifikována. Výstupní kapilára detektoru byla zkrácena a byla vyzkoušena kapilára s větším vnitřním průměrem ( $1 \text{ mm}$ ). Aby bylo dosaženo co nejkratší délky výstupní kapiláry, bylo nezbytné upravit a zkrátit i spojovací materiál, což je možné jen do určité míry, aby zůstalo zachováno spojení obou kapilár (obr. 4.14).

Rozšíření vnitřního průměru kapiláry zlepšilo tvar píku i stupeň konverze detektoru, porovnání statisticky zpracovaných výsledků (výšky, plochy a šířky píku) pro

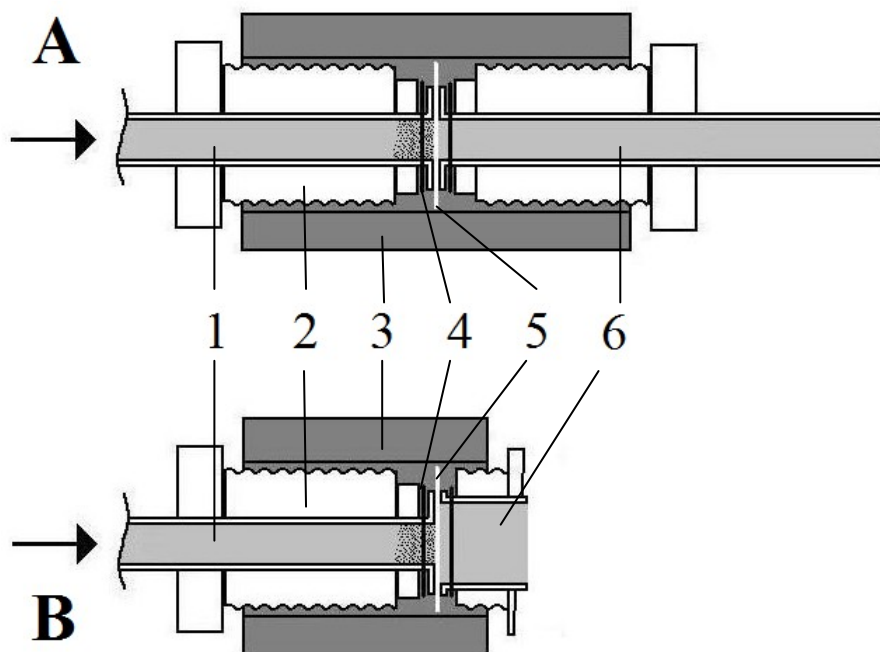
kapiláry s širším a užším vnitřním průměrem je uvedeno v tabulce 4.4. Jelikož širší výstupní kapilára poskytuje výrazně lepší odezvu detektoru, byly další úpravy prováděny již jen s touto kapilárou.

Ke zlepšení tvaru píku došlo i při zkrácení výstupní kapiláry. Statisticky zpracované výsledky tohoto měření jsou uvedeny na obrázku 4.15. Bohužel zkracování výstupní kapiláry pod 5 mm je vzhledem ke konstrukci detektoru velice obtížné. Kapiláru lze ještě zkrátit, ale další zkrácení spojovacího šroubu už možné není. Šroub pak překrývá celou výstupní kapiláru a komplikuje tak práci s detektorem. Jako optimální délka výstupní kapiláry byla určena hodnota 5 mm.

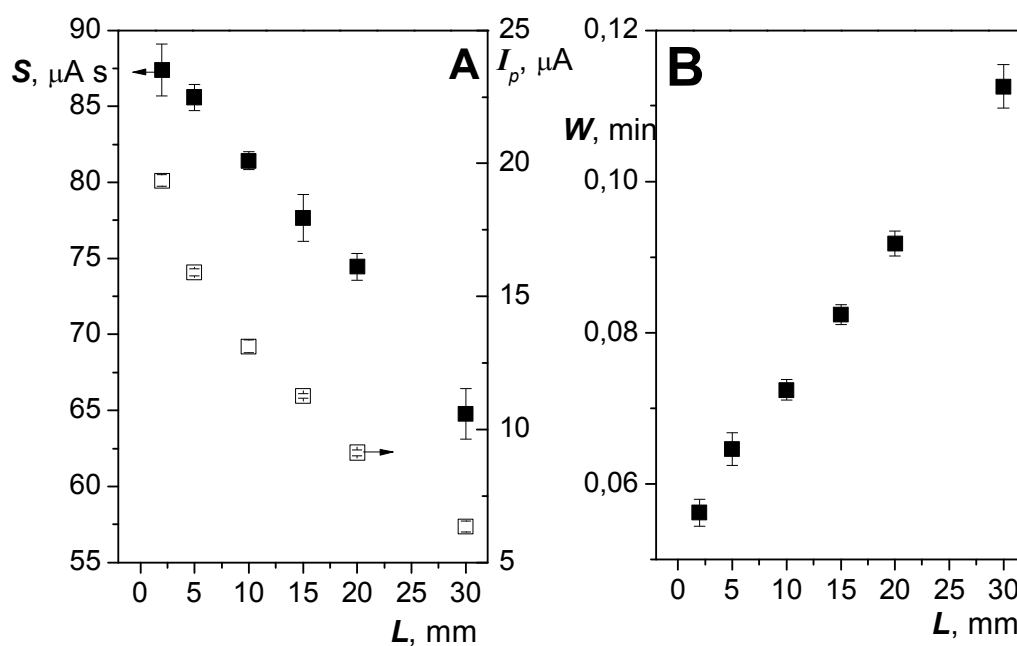
Změna rozměrů pracovní kapiláry vedla i k zlepšení průběhu hydrodynamického voltamogramu hexakyanoželezitanu draselného a k výraznému přiblížení k teoretické hodnotě půlvolnového potenciálu redoxního systému  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , na obrázku 4.16 je uvedeno srovnání hydrodynamických voltamogramů hexakyanoželezitanu draselného zaznamenaných při práci s nezkrácenou kapilárou o menším vnitřním průměru a s optimalizovanou výstupní kapilárou.

Je vidět, že zkrácení a rozšíření výstupní kapiláry vedlo ke zlepšení tvaru píků a průběhu hydrodynamického voltamogramu hexakyanoželezitanu draselného, jelikož byla snížena vzdálenost pracovní a referentní elektrody, a tím zmenšen odpor mezi elektrodami. Pro další měření byla již vždy použita výstupní kapilára o těchto rozměrech: délka 5 mm a vnitřní průměr 1 mm.

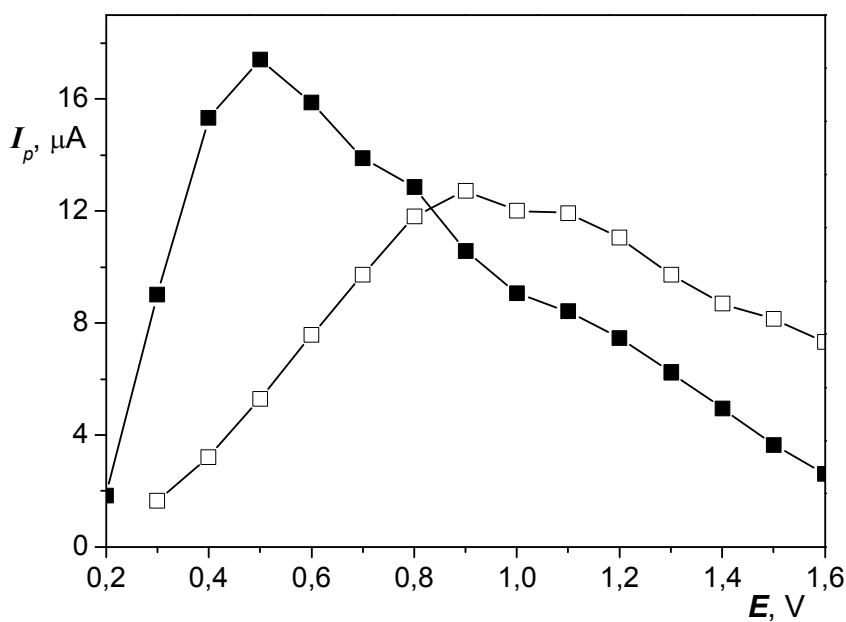
Po konstrukčních úpravách byl proměřen odpor mezi jednotlivými elektrodami coulometrického detektoru při jeho uspořádání v přepadové nádobce (obr. 3.3), a to v roztocích síranu sodného o koncentraci  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  a B-R pufru o pH 4. Odpor mezi jednotlivými elektrodami byl vždy měřen třikrát. Statisticky zpracované výsledky vodivosti jsou uvedeny v tabulce 4.5.



Obr. 4.14 Porovnání základní konstrukce (A) a zkráceného detektoru (B); 1 – vstupní kapilára, 2 – spojovací šroub, 3 – spojka, 4 – ocelová podložka, 5 – filtrační papír, 6 – výstupní kapilára.



Obr. 4.15 Vliv zkracování výstupní kapiláry na plochu a výšku píku (A) a na šířku píku v polovině jeho výšky (B); měřeno pro vzorek hexakynoželezitanu draselného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  v nosném roztoku síranu sodného  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ , při průtokové rychlosti  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , vkládaném potenciálu  $+0,5 \text{ V}$  a objemu dávkovací cívky  $10 \text{ μl}$ .



Obr. 4.16 Porovnání průběhu hydrodynamického voltamogramu při měření se zkrácenou a rozšířenou výstupní kapilárou (plné symboly) oproti užší a delší výstupní kapiláře (prázdné symboly); měřeno pro vzorek hexakynoželezitanu draselného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  v nosném roztoku síranu sodného  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ , při průtokové rychlosti  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , vkládaném potenciálu  $+0,5 \text{ V}$  a objemu dávkovací cívky  $10 \mu\text{l}$ .

Tabulka 4.4 Statisticky zpracované hodnoty výšky, plochy a šířky píku v polovině jeho výšky a jejich porovnání pro výstupní kapiláru o průměru 0,5 a 1 mm.

$l$	$d$	$S$	$I_p$	$W \cdot 10^2$
mm	mm	$\mu\text{A s}$	$\mu\text{A}$	min
30	0,5	$55,39 \pm 0,40$	$4,73 \pm 0,05$	$14,47 \pm 0,19$
	1	$64,77 \pm 1,65$	$6,35 \pm 0,21$	$11,27 \pm 0,28$
5	0,5	$72,68 \pm 0,49$	$11,23 \pm 0,05$	$8,67 \pm 0$
	1	$85,59 \pm 0,86$	$15,90 \pm 0,13$	$6,47 \pm 0,18$

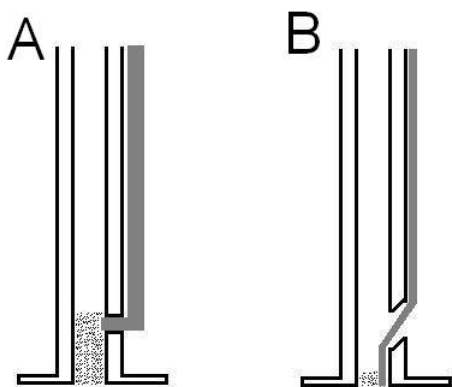
Tabulka 4.5 Vodivost mezi jednotlivými elektrodami coulometrického detektoru (w je pracovní elektroda, p je pomocná elektroda a r je referentní elektroda).

nosný roztok	vodivost mezi elektrodami ( $\mu\text{S}$ )		
	p-r	w-r	w-p
0,1 mol l <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25,02 $\pm$ 0,21	26,81 $\pm$ 3,21	5,65 $\pm$ 0,22
B-R pufr o pH 4	22,69 $\pm$ 3,11	17,37 $\pm$ 0,88	5,96 $\pm$ 0,062

#### 4.2.2.3. Změna způsobu zavedení kontaktu

Základní způsob zavedení kontaktu neumožňuje dostatečné snížení uhlíkové vrstvy v detektoru. Uhlíková vrstva v detektoru je pak větší než je hodnota teoreticky potřebná, což by mohlo zabraňovat dostatečnému rozložení vkládaného potenciálu v celé uhlíkové vrstvě a negativně ovlivňovat výsledky. Zároveň vyšší vrstva uhlíku klade větší hydrodynamický odpor a přispívá tak k nárůstu pracovního tlaku. Aby byl tento konstrukční nedostatek odstraněn, byl otestován jiný způsob zavedení platinového kontaktu do kapiláry pracovního detektoru. I v tomto případě je kontakt zaváděn skrz stěnu kapiláry, ale je použit drátek o menším průměru, který je dále veden až k ústí kapiláry (obr. 4.17 B). Kontakt umožnil snížení uhlíkové vrstvy, ale toto uspořádání přineslo celou řadu nedostatků: kontakt byl náchylnější k poškození, náročnější na přípravu, vyžadoval větší otvor ve stěně kapiláry, a tím byla snížena životnost detektoru, byl změněn vnitřní průměr kapiláry a její objem byl pak obtížně definovatelný. Při lepení otvoru docházelo často k ucpání vnitřní oblasti kapiláry a zřejmě i k dalším změnám vnitřního průměru a tvaru kapiláry. Tento způsob zavedení kontaktu byl testován při snaze zlepšit průběh hydrodynamických voltamogramů u askorbové kyseliny a hydrochinonu, ale jeho pomocí nebylo dosaženo výrazně odlišných výsledků. Vliv výšky sloupce na rozložení vkládaného potenciálu tedy nebyl prokázán. Tento jev bude zřejmě způsoben uspořádáním pracovní a referentní elektrody, které nejde změnit bez výrazné úpravy konstrukce detektoru. Vliv tohoto faktoru ale není tak významný, aby znemožnil aplikaci detektoru pro analytická měření, a proto byla raději zachována jednoduchost konstrukce detektoru. Pro ostatní měření byl tedy upřednostněn původní systém zavádění kontaktu (obr 4.17 A).





Obr. 4.17 Schéma testovaných způsobů zavádění kontaktu do přírodní kapiláry

### 4.2.3. Plnění coulometrického detektoru

Porézní coulometrický detektor není možné v případě pasivace reaktivovat mechanickým čištěním. Pasivovanou náplň je nutné vyměnit. V případě komerčních přístrojů je tato výměna jednoduchou záležitostí, ale je také relativně finančně náročná. Proto byl tento coulometrický detektor konstruován tak, aby byla zachována jednoduchost výměny pasivované náplně a nedocházelo tak k výraznému zvýšení nákladů jednotlivých stanovení. Plnění bylo upravováno ve snaze o dosažení reprodukovatelné výšky sloupce při jednotlivých výměnách náplně a byla prozkoumána možnost budoucí automatizace plnění detektoru.

#### 4.2.3.1. Princip plnění coulometrického detektoru

Detektor je plněn suspenzí mikrokuliček skelného uhlíku ve vhodném rozpouštědle. Rozpouštědlo je voleno podle jeho hustoty – hodnota blízká hustotě skelného uhlíku zajišťuje, že je suspenze homogenní po dostatečně dlouhou dobu potřebnou pro naplnění detektoru. Jako rozpouštědlo se nejlépe osvědčil nitromethan. Po naplnění je detektor připojen na pumpu a nitromethan je z něho vymyt methanolem.

#### 4.2.3.2. Způsoby plnění detektoru

Coulometrický detektor byl původně plněn směsí uhlíku a nitromethanu z injekční stříkačky. Šlo o jednoduchý systém nenáročný na experimentální uspořádání.

K plnění detektoru je však potřeba vynaložit dostatečný tlak a k tomuto účelu není ruční plnění optimální. Hlavním nedostatkem tohoto systému však byla nereprodukovatelnost plnění detektoru, délka výsledné vrstvy z mikročastic skelného uhlíku se pohybovala od 3 až do 15 mm (RSD = 63 %). Detektor tedy neměl dostatečně definovaný objem pracovní elektrody.

Ve snaze o zlepšení reprodukovatelnosti plnění byl vyzkoušen experimentálně náročnější systém plnění detektoru. Injekční stříkačka byla nahrazena dávkovací cívku napojenou na pumpu a dvojcestný ventil. Jako nosný roztok byl použit methanol, který zároveň sloužil k vymývání nitromethanu z detektoru. Tento systém plnění vykazoval výrazně lepší reprodukovatelnost (RSD = 5,5 %), a proto byl použit pro veškerou další práci s coulometrickým detektorem.

#### *4.2.3.3. Regulace výšky uhlíkového sloupce v coulometrickém detektoru*

Zlepšení reprodukovatelnosti plnění detektoru dále umožňuje regulovat výšky uhlíkového sloupce v coulometrickém detektoru. Čím delší je uhlíková zóna, tím větší klade v průtoku hydrodynamický odpor, a tím větší je výsledný pracovní tlak. Výšku uhlíkového sloupce lze upravovat použitím menší plnicí smyčky nebo lze plnit detektor směsí chudší na uhlíkovou složku. V druhém případě odpadá nutnost výměny smyček a postup je jednodušší a rychlejší, proto byla výška uhlíkové zóny regulována změnou poměru složení směsi uhlíkových mikročastic a nitromethanu. Pro plnění byla použita plnicí smyčka o objemu 500  $\mu$ l, pro kterou byly vyzkoušeny dva poměry složení uhlíkové suspenze, a to 10 mg mikročastic skelného uhlíku na 2 ml nitromethanu a 10 mg na 4 ml. Další snižování uhlíkové vrstvy již nebylo úspěšné, uhlíková vrstva byla již zřejmě příliš nízká a nedosahovala ke kontaktu. Pro oba poměry plnicí směsi byla změřena výška uhlíkového sloupce. Statisticky zpracované výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.6.

Změnou plnění se podařilo zlepšit jeho reprodukovatelnost a umožnit snadnou úpravu výšky sloupce uhlíkové vrstvy. Zároveň byla snížena výška plnění detektoru, a tak došlo ke snížení pracovního tlaku.

Tabulka 4.6 Výška uhlíkového sloupce v závislosti na poměru složení plnicí suspenze; x představuje hmotnost uhlíkové složky (mg) smíchané s nitromethanem (y) (ml).

x/y	L	RSD
	mm	%
10/2	$9,0 \pm 0,5$	5,5
10/4	$3,1 \pm 0,4$	13,5

#### 4.2.3.4. Výpočet pórovitosti

Ze znalosti délky uhlíkového sloupce v coulometrickém detektoru lze vypočítat pórovitost detektoru, což je základní hodnota charakterizující uhlíkovou náplň. Z množství nadávkovaného skelného uhlíku a ze znalosti jeho hustoty (tabulka 2.1) lze určit celkový objem, v našem případě  $8,93 \cdot 10^{-10} \text{ m}^3$  a počet mikročastic naplněných do coulometrického detektoru i celkový povrch skelného uhlíku v coulometrickém detektoru ( $3,57 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ ).

Objem, který zaujímají uhlíkové zóny v kapiláře detektoru ( $1,16 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3$ ), pak lze určit jednoduchým geometrickým výpočtem ze znalosti délky uhlíkového sloupce a vnitřního průměru kapiláry.

Z vypočtených hodnot byla určena pórovitost náplně z mikročastic skelného uhlíku, která je rovna 22,9 %.

#### 4.2.3.5. Výpočet teoretické výšky uhlíkového sloupce potřebné pro elektrochemickou reakci

Aby bylo možné plnit elektrochemický detektor co nejmenším sloupcem uhlíkových mikročastic při zachování maximálního možného stupně konverze, je třeba určit teoretickou hodnotu výšky sloupce uhlíku potřebnou pro průběh elektrochemické reakce v konstruovaném coulometrickém detektoru, kterou lze vypočítat z rovnice (2.4).

Z experimentálně určeného stupně konverze byla z této rovnice vypočtena hodnota výšky sloupce uhlíkové náplně na 0,75 mm. Coulometrický detektor však vzhledem ke způsobu připojení elektrického kontaktu není možné plnit na tak nízkou hodnotu. Experimentálně se povedlo plnit detektor na výšku uhlíkového sloupce

přibližně 3 mm a tato hodnota byla použita při další práci s detektorem. Při této výšce uhlíkového sloupce pracovní tlak (při nízkých průtokových rychlostech pod  $1 \text{ ml min}^{-1}$ ) nepřekračuje limitní hodnotu uváděnou výrobcem nízkotlaké teflonové kapiláry a s detektorem lze pracovat bez nebezpečí jeho poškození.

#### 4.2.3.6. Experimentální ověření vlivu výšky sloupce na odezvu detektoru

Jelikož výška uhlíkového sloupce v detektoru při plnění mírně kolísá, byla ověřena robustnost odezvy detektoru v závislosti na této změně.

Směs nitromethanu a mikročástic uhlíku byla připravována tak, aby se v detektoru postupně snižovala uhlíková vrstva. Měření bylo prováděno, dokud uhlíková vrstva byla dostatečně vysoká, aby detektor poskytoval signál.

Proměřit se podařilo tři směsi uhlíkových mikročástic a nitromethanu, a to 10 mg uhlíkových mikročástic na 2 ml nitromethanu, 10 mg na 3 ml a 10 mg na 4 ml. Při dalším snížení uhlíkové vrstvy už detektor poskytoval odezvu jen z platinového kontaktu. Relativní směrodatná odchylka pro výšky píku pořázená ze tří různě vysokých náplní detektoru činí 1,9 %. Statisticky zpracované výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.7. Z výsledků je patrné, že detektor je dostatečně robustní vůči změnám ve výšce plnění.

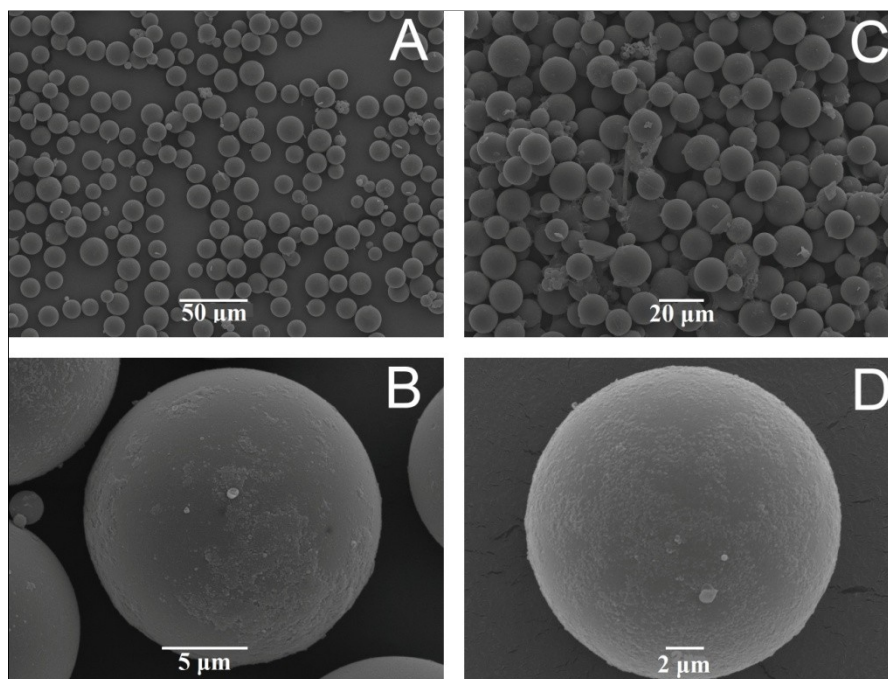
Tabulka 4.7 Statisticky zpracované výsledky výšky píku pro různou výšku uhlíkové náplně coulometrického detektoru; x představuje hmotnost uhlíkové složky (mg) smíchané s nitromethanem (y) (ml).

x/y	$I_p$ $\mu\text{A}$	RSD %
10/2	$15,19 \pm 0,20$	1,3
10/3	$14,63 \pm 0,17$	1,2
10/4	$14,83 \pm 0,11$	0,76
celkem	$14,88 \pm 0,28$	1,9

#### 4.2.3.7. Mikroskopická studie vlivu tlaku na mikročástice skelného uhlíku

Při nižších průtokových rychlostech sice pracovní tlak neroste nad limitní hodnotu pro nízkotlakou teflonovou kapiláru, ale to už neplatí při průtoku nosného roztoku nad  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Pracovní tlak někdy dosahoval i hodnoty nad 8 MPa. Při normální práci jsou uhlíkové mikročástice skelného uhlíku vystaveny po delší dobu (řádově desítky minut) tlaku okolo 4 MPa. Je zajímavou otázkou, jak reaguje samotná uhlíková částice na tyto okolnosti. Uhlíkové mikrokuličky by zmíněný tlak měly ustát bez úhony, tento předpoklad byl ověřen pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM).

Byl pořízen snímek mikrokuliček skelného uhlíku dodaného výrobcem a snímek stejných částic vystavených po dobu 15 minut působení průtoku nosného roztoku síranu sodného o koncentraci  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  při tlaku 8 MPa, což odpovídá průtokové rychlosti přibližně  $2 \text{ ml min}^{-1}$ . Vzorek pro SEM byl nejprve oboustrannou lepicí páskou přichycen na terč a následně potažen 3nm vrstvou zlata, takto připravený vzorek byl vložen do skenovacího mikroskopu (parametry přístroje: Acc Volt: 20 kV a spot size: 43). Oba pořízené snímky (obr. 4.18) se od sebe výrazně neliší. Uhlíkové mikročástice tedy skutečně odolávají i vyššímu tlaku.



Obr. 4.18 Snímky mikrokuliček skelného uhlíku nevystavených působení tlaku (A, B) a vystavených působení tlaku 9 MPa po dobu 15 minut (C,D).

#### 4.2.3.8. *Možná automatizace plnění dávkovací cívky*

Současný způsob plnění detektoru je sice dostatečně jednoduchý, ale jeho nevýhodou je zdlouhavost. Detektor je nutné rozmontovat, aby bylo možné ho vyprázdnit a následně opět před naplněním složit. Opakovaná manipulace navíc snižuje životnost detektoru. Tento postup by šlo zjednodušit, kdyby byl uhlík z detektoru v podstatě vysáván skrz přírodní kapiláru a odnášen proudem kapaliny bez nutnosti detektor rozebrat. Plnicí zařízení by bylo konstrukčně náročnější, ale plnění by bylo nejen jednodušší, ale i rychlejší a bez výrazného nárůstu nákladů.

Aby úvahy o tomto zlepšení plnění byly lépe podložené, bylo ověřeno, jestli je možné detektor zpětně vyprázdnit proudem kapaliny a jestli tuto opakovanou proceduru vydrží filtrační papír, který slouží jako opora uhlíkovým mikročásticím v detektoru. Detektor byl opakovaně plněn, vystavován toku nosného roztoku a vyprazdňován vysátím jeho obsahu pomocí injekční stříkačky, přičemž filtrační papír nebyl měněn. Mezi tím byl kontrolován stav detektoru.

Tímto jednoduchým testem bylo ověřeno, že uhlíkové mikročástice je možné z detektoru vyprazdňovat bez rozebrání detektoru, a že je možné v budoucnu uvažovat o vylepšení systému jeho plnění.

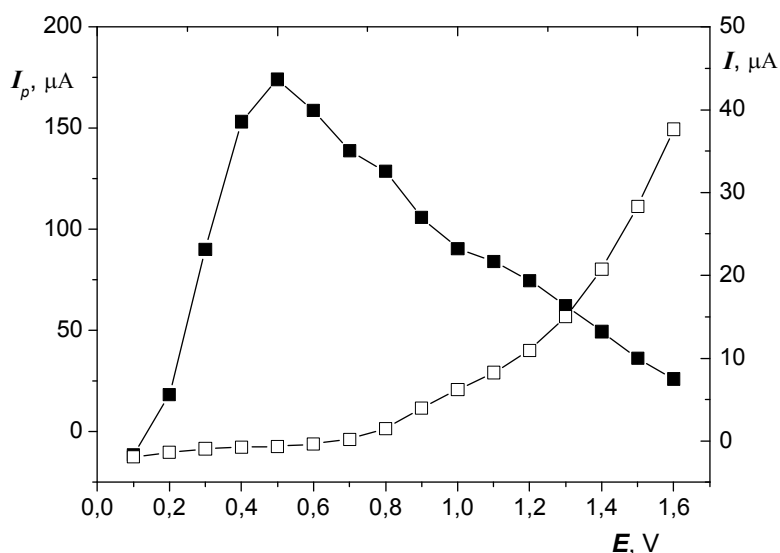
#### 4.2.4. **Stanovení hexakyanoželezitanu draselného jako modelové látky**

Otestování konstrukčně upraveného detektoru a jeho funkčnosti bylo provedeno stanovením modelové látky. K tomuto účelu byl zvolen hexakyanoželezitan draselný, jelikož jde o dobře prostudovanou, běžně používanou a strukturně jednoduchou látku. Jako nosný roztok pro toto stanovení posloužil síran sodný o koncentraci  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ .

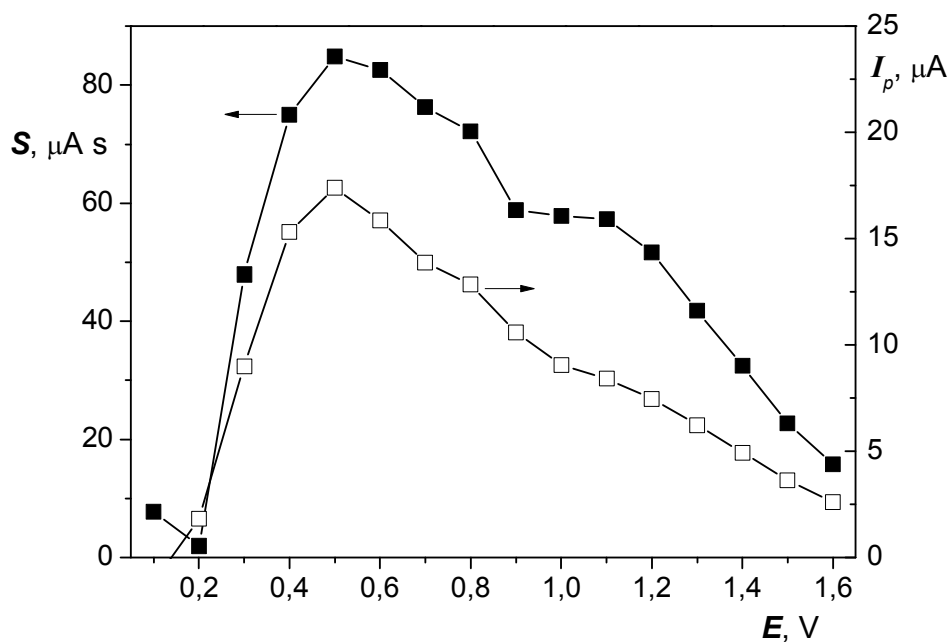
##### 4.2.4.1. *Hydrodynamický voltamogram*

Aby bylo dosaženo vysokého stupně konverze, je třeba stanovovat vzorek hexakyanoželezitanu draselného za optimálních podmínek. První optimalizovanou hodnotou byl potenciál vkládaný na pracovní elektrodu. K určení tohoto parametru bylo třeba proměřit hydrodynamický voltamogram. Vzorek hexakyanoželezitanu draselného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  byl měřen při průtokové rychlosti  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  a

dávkovaném objemu 10  $\mu\text{l}$  a různých hodnotách potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu. Výsledný hydrodynamický voltamogram je znázorněn na obrázku 4.19 a na obrázku 4.20 je znázorněna závislost výšky a plochy píku na hodnotě potenciálu. Optimální hodnota vkládaného potenciálu byla stanovena na + 0,5 V a byla použita pro všechna následující měření.



Obr.4.19 **Hydrodynamický voltamogram hexakynoželozitanu draselného ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ); výška píků (plné symboly) a proud pozadí (prázdné symboly), měřeno v nosném roztoku síranu sodného  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ , při průtokové rychlosti  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  a objemu dávkovací cívky  $10 \mu\text{l}$ .**

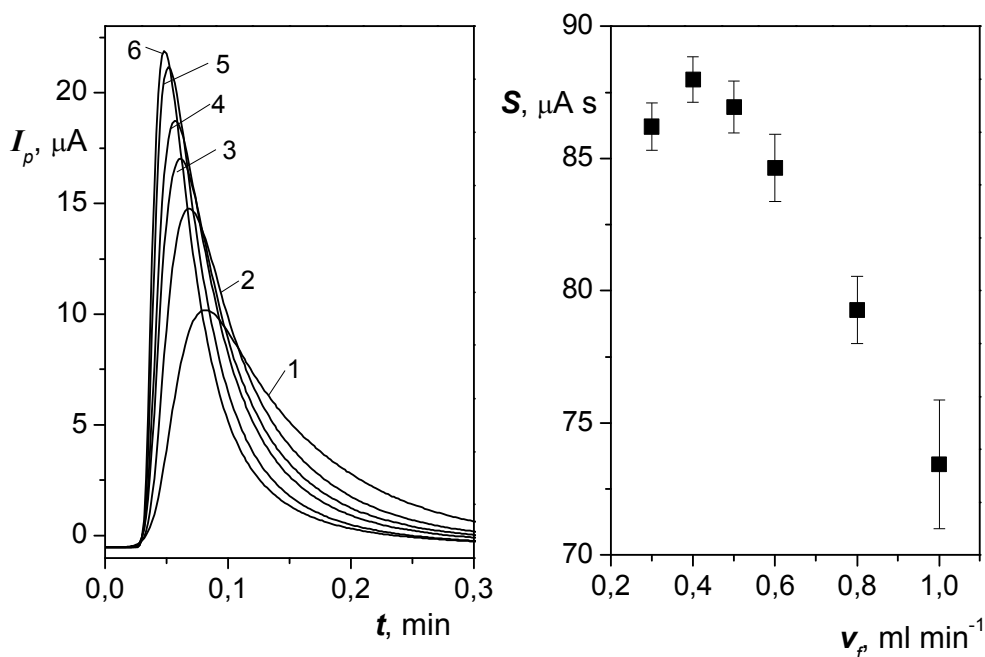


Obr. 4.20 Závislost výšky píku (prázdné symboly) a plochy píku (plné symboly) na hodnotě potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu; měřeno pro vzorek hexakynoželezitanu draselného ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v nosném roztoku síranu sodného  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ , při průtokové rychlosti  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  a objemu dávkovací cívky  $10 \mu\text{l}$ .

#### 4.2.4.2. Závislost průtokové rychlosti

Dalším krokem optimalizace bylo určení průtokové rychlosti. Běžně coulometrické detektory pracují při nízkých průtokových rychlostech, aby bylo dosaženo vysokého stupně konverze. Byla proměřena závislost odezvy detektoru na průtokové rychlosti od  $0,3$  do  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Při vyšších průtokových rychlostech dosahoval pracovní tlak systému větších hodnot, než umožňuje materiál použitý pro konstrukci detektoru. Ukázka tvaru píků a statisticky zpracované výsledky pro plochu píku jsou znázorněny na obrázku 4.20. Nárůst průtokové rychlosti doprovází nárůst výšky píků. Jejich plocha se při nižších průtokových rychlostech drží takřka konstantní, ale při vyšších průtocích nad  $0,6 \text{ ml min}^{-1}$  již klesá. Tyto výsledky jsou v dobrém souladu s teorií. Z intervalu, kde je plocha píku konstantní, byla vybrána nejvyšší průtoková rychlost mimo krajní hodnoty intervalu. Optimální průtoková rychlost byla stanovena na  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ .





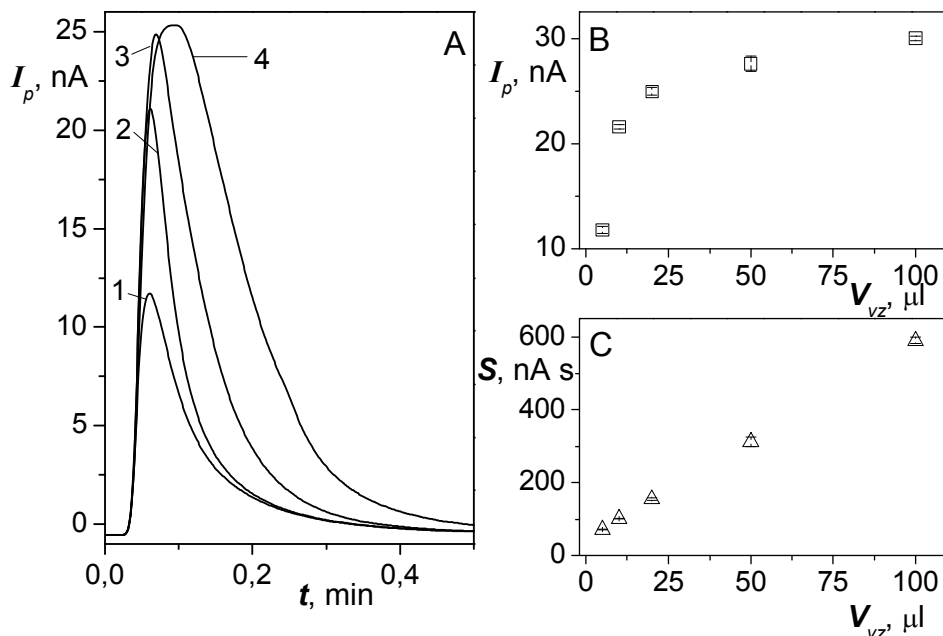
Obr. 4.20 Závíslost odezvy signálu na průtokové rychlosti, ukázka tvaru píku (A) při průtokové rychlosti 0,3 (1), 0,4 (2), 0,5 (3), 0,6 (4), 0,8 (5) a 1,0 (6) ml min $^{-1}$  a statisticky zpracované výsledky závislosti plochy na průtokové rychlosti (B); měřeno pro vzorek hexakynoželezitanu draselného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol l $^{-1}$  v nosném roztoku síranu sodného 0,1 mol l $^{-1}$ , vkládaném potenciálu + 0,5 V a objemu dávkovací cívky 10  $\mu$ l.

#### 4.2.4.3. Objem dávkování

Dalším krokem při optimalizaci stanovení hexakynoželezitanu draselného pomocí vyvíjeného detektoru bylo určení optimálního objemu plnicí cívky. Za tímto účelem byla proměřena závislost změny signálu na změně tohoto parametru. Byla změřena odezva detektoru při dávkování různého množství vzorku, a to pro 5, 10, 20, 50 a 100  $\mu$ l dávkovací smyčky.

Záznam charakteristických píků je uveden na obrázku 4.21, z něhož je patrné, že optimální objem dávkovací smyčky je 10, popřípadě 20  $\mu$ l. U dalších píků již nedochází k výraznému nárůstu výšky, ale pouze k jejich rozšiřování. Mezi těmito hodnotami byla upřednostněna plnicí cívka o objemu 10  $\mu$ l.

Jako optimální pracovní podmínky byly tedy zvoleny: vkládaný pracovní potenciál + 0,5 V, průtoková rychlost 0,5 ml min<sup>-1</sup> a objem dávkovací cívky 10 μl. Další měření jsou prováděna při dodržování těchto podmínek.



Obr.4.21 Vliv objemu dávkovací cívky na odezvu coulometrického detektoru; ukázka tvaru píku (A) pro objem dávkovací cívky 5 μl (1), 10 μl (2), 25 μl (3) a 50 μl (4), závislost výšky píku (B) a plochy píku (C) na objemu dávkovací cívky; měřeno pro vzorek hexakyanoželezitanu draselného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup> v nosném roztoku síranu sodného 0,1 mol l<sup>-1</sup>, průtokové rychlosti 0,5 ml min<sup>-1</sup> a vkládaném potenciálu + 0,5 V.

#### 4.2.4.4. Stupeň konverze

Správně fungující coulometrický detektor by měl mít vysoký stupeň konverze blížící se 100 %. Stupeň konverze lze určit z výpočtu náboje z Faradayova zákona:

$$Q = R_{konv} \cdot z \cdot F \cdot c \cdot V_{vz}, \quad (4.1)$$

kde  $Q$  [C] a  $V_{vz}$  je dávkovaný objem [l]. Ostatní symboly mají obvyklý význam.

Výsledný stupeň konverze pro vzorek hexakyanoželezitanu draselného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup> měřený za optimálních podmínek je 90,1 %. Konstrukčními úpravami došlo k výraznému zlepšení tohoto parametru, protože prvotní konstrukce dosahovala stupně konverze okolo 60 %. Podařilo se dosáhnout vysoké hodnoty stupně konverze.

#### 4.2.4.5. Stálost signálu a reprodukovatelnost měření

Důležitou vlastností detekce nejenom při kontinuálních měření v průtokových metodách je stálost signálu v čase a reprodukovatelnost jednotlivých následujících měření. Pro ověření stálosti byly proměřeny tři záznamy, každý s nově naplněnou elektrodou. Všechny tři záznamy byly pořízeny za optimálních pracovních podmínek, tedy při průtokové rychlosti  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , při vkládaném potenciálu  $+0,5 \text{ V}$  a pro objem plnicí smyčky  $10 \text{ } \mu\text{l}$  a pro stejnou koncentraci vzorku hexakynoželezitanu draselného  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . Vyhodnoceno bylo v případě první náplně 30 a pro další dvě náplně 20 po sobě jdoucích měření, statisticky zpracované výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.8 a ukázka typického záznamu měření je na obrázku 4.22.

Do reprodukovatelnosti měření byla zahrnuta všechna měření za optimálních podmínek pro vzorek hexakynoželezitanu draselného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , celkově jde o šest nezávislých měření, vždy s nově naplněným detektorem. Statisticky zpracované výsledky pro určení reprodukovatelnosti jsou uvedeny v tabulce 4.9.

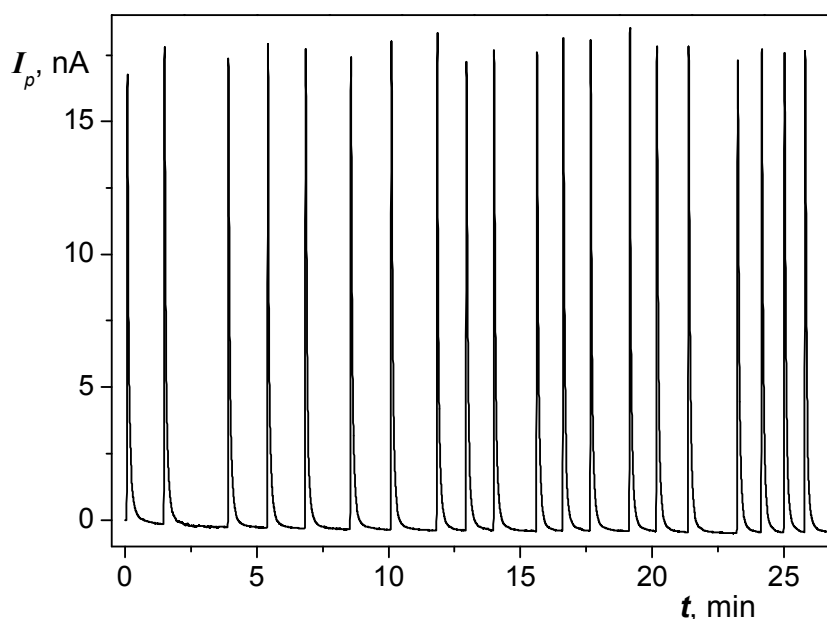
Výsledky potvrzují dobrou stálost signálu i reprodukovatelnost měření vyvíjeného coulometrického detektoru.

Tabulka 4.8 Statisticky zpracované výsledky výšky, plochy a šířky píku měření stálosti signálu pro tři po sobě jdoucí náplně detektoru.

náplň	počet měření	$I_p$ $\mu\text{A}$	RSD %	$S$ $\mu\text{A s}$	RSD %
1.	30	$17,89 \pm 0,57$	3,28	$88,65 \pm 2,18$	2,45
2.	20	$17,31 \pm 0,41$	2,37	$90,92 \pm 1,19$	1,30
3.	20	$18,14 \pm 0,35$	1,19	$90,36 \pm 1,11$	1,23

Tabulka 4.9 Statisticky zpracované výsledky výšky a plochy píku reprodukovatelnosti signálu detektoru pro šest na sobě nezávislých náplní detektoru.

	$I_p$ $\mu\text{A}$	$S$ $\mu\text{A s}$	$W$ min
	$17,68 \pm 0,35$	$88,26 \pm 2,24$	$0,063 \pm 0,0032$
RSD (%)	1,98	2,53	5,12

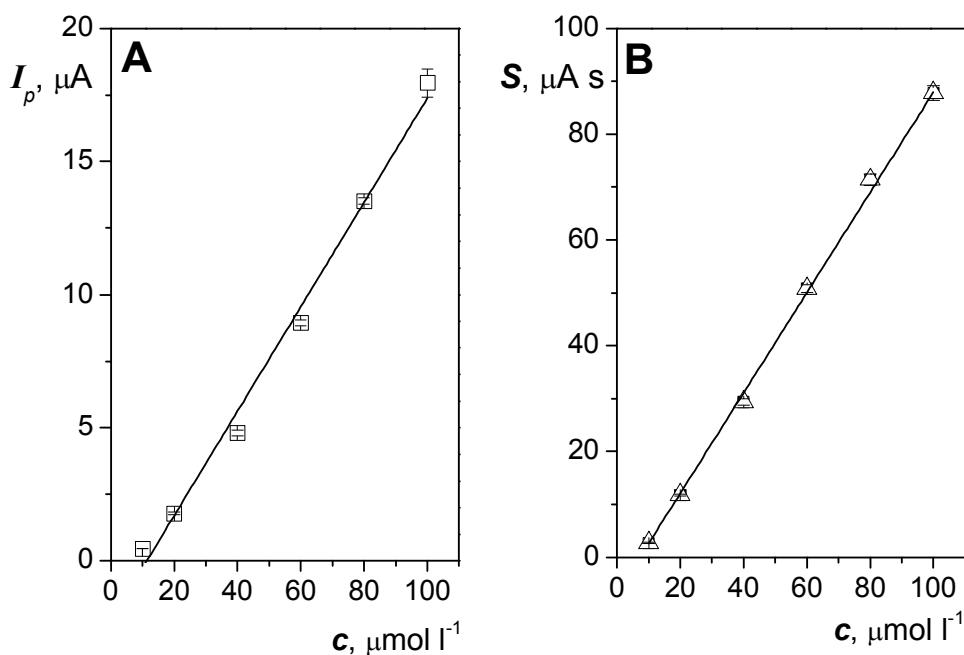


Obr. 4.22 Ukázka záznamu měření stálosti odezvy coulometrického detektoru; 20 po sobě jdoucích nástříků vzorku hexakyanoželezitanu draselného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\Gamma^{-1}$  v nosném roztoku síranu sodného 0,1 mol  $\Gamma^{-1}$ , průtokové rychlosti 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ , vkládaném potenciálu + 0,5 V a objemu dávkovací cívky 10  $\mu\text{l}$ .

#### 4.2.4.6. Kalibrační závislost

Jednou z důležitých vlastností detektoru je dynamický rozsah, respektive linearita koncentrační závislosti. K ověření této závislosti byla naměřena kalibrační křivka v koncentračním rozsahu od  $1 \cdot 10^{-4}$  do  $1 \cdot 10^{-5}$  mol  $\Gamma^{-1}$ . Měření byla prováděna za optimálních pracovních podmínek. Kalibrační závislosti pro výšku a plochu píku jsou na obrázku 4.23.

Naměřená závislost splňuje podmínky linearity, zvláštní je ale značný záporný úsek kalibrační křivky. Křivka by mohla být zkreslována konstrukčním uspořádáním detektoru. Žádnou konstrukční úpravou však nebylo dosaženo odstranění tohoto nedostatku.



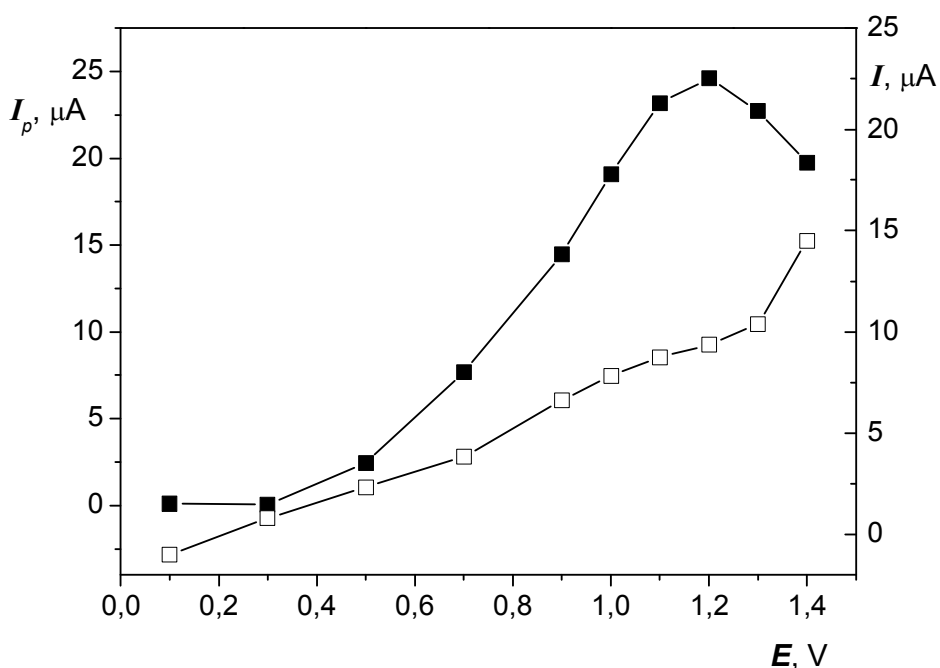
Obr. 4.23 Kalibrační přímka vyhodnocená z výšky píku (A) a plochy píku (B); měření vzorku hexakyanoželezitanu draselného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  v nosném roztoku síranu sodného  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ , průtokové rychlosti  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , vkládaném potenciálu  $+0,5 \text{ V}$  a objemu dávkovací cívky  $10 \mu\text{l}$ .

#### 4.2.5. Stanovení hydrochinonu coulometrickým detektorem

Po úpravách konstrukce a otestování byl detektor použit na stanovení organické látky hydrochinonu, která posloužila pro ověření funkčnosti detektoru i v případě strukturně komplikovanějších látek. Pomocí metody FIA byla provedena optimalizační měření (určení detekčního potenciálu, průtokové rychlosti a objemu dávkovaného vzorku), měření stálosti odezvy detektoru při kontinuálním měření hydrochinonu a kalibrační závislost.

#### 4.2.5.1. Hydrodynamický voltamogram hydrochinonu

Hodnota detekčního potenciálu má výrazný vliv na odezvu detektoru a její optimální hodnota se určuje z hydrodynamického voltamogramu. Při použití B-R pufru o pH 2 byla změřena závislost odezvy detektoru na potenciálu vkládaném na pracovní elektrodu. Výsledný hydrodynamický voltamogram je znázorněn na obrázku 4.24. Při hodnotě potenciálu + 1,2 V bylo dosaženo nejvyšší plochy i výšky píku, proto byla tato hodnota určena jako optimální a byla použita pro následující měření.



Obr 4.24 **Hydrodynamický voltamogram hydrochinonu** ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ); výška píků (plné symboly) a proud pozadí (prázdné symboly), nosný roztok B-R pufr o pH 2, průtoková rychlost  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  a objem dávkovací cívky  $10 \mu\text{l}$ .

#### 4.2.5.2. Selektivita detektoru a stupeň konverze při stanovení hydrochinonu

Podle tvaru hydrodynamických voltamogramů lze ověřit elektrochemickou selektivitu průtokových detektorů. Hydrodynamický voltamogram, který má prudší nárůst, má i větší elektrochemickou selektivitu.

Pro reversibilní oxidační děj může být hydrodynamický voltamogram vyjádřen matematickým vztahem [61]:

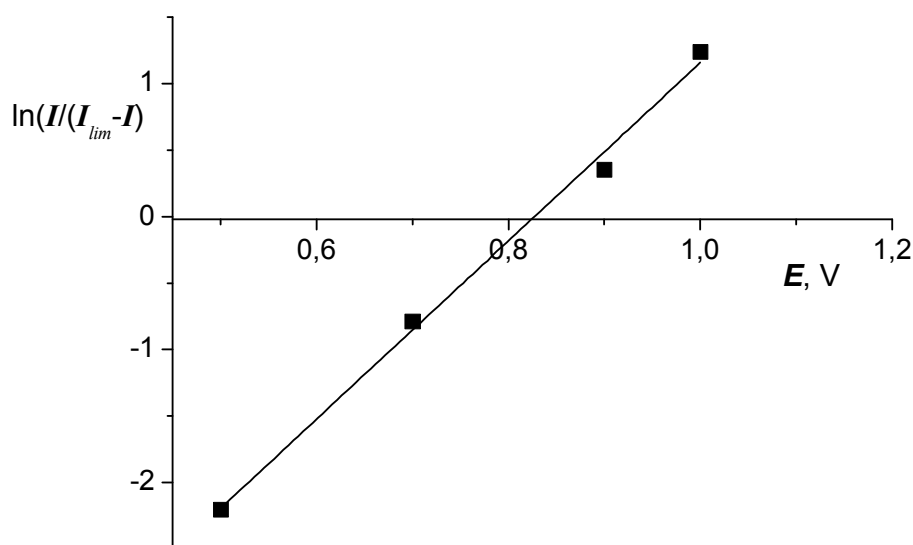
$$E = E_{1/2} + \left(\frac{R \cdot T}{z \cdot F}\right) \cdot \ln \left(\frac{I}{I_{lim} - I}\right), \quad (4.2)$$

kde  $E_{1/2}$  je půlvlnový potenciál [V],  $I_{lim}$  limitní proud [A] a  $I$  proud [A] při potenciálu  $E$  [V]. Ostatní symboly mají obvyklý význam. Menší strmost křivky, než je teoretická hodnota, by mohla být způsobena špatným rozložením potenciálu na pracovní elektrodě, nebo špatnou kompenzací  $iR$  spádu [37].

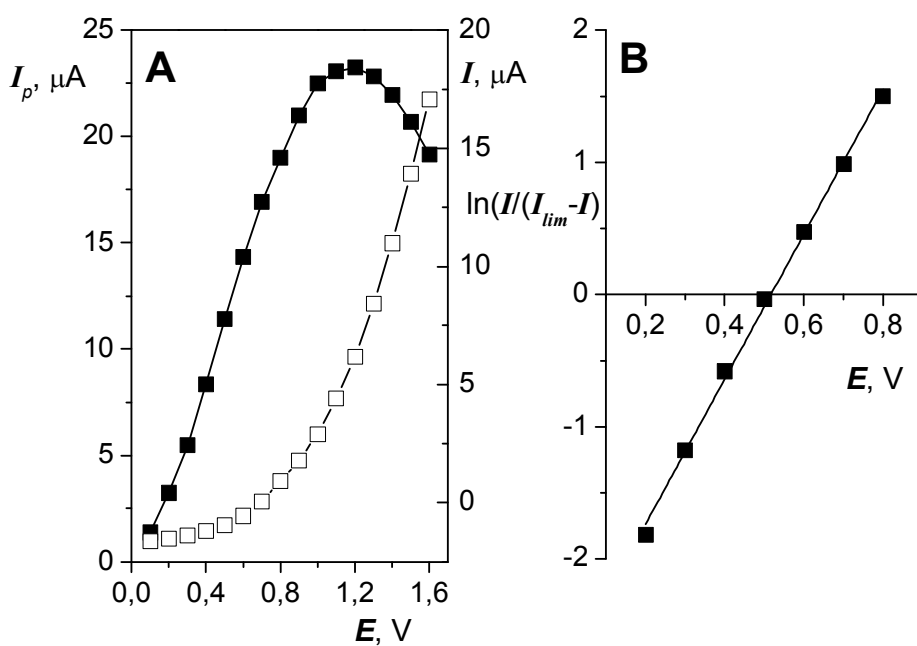
Selektivita hydrodynamických voltamogramů byla otestována vynesím závislosti  $\ln(I/(I_{lim}-I))$  na vkládaném potenciálu pro hydrochinon proměřený při pH 2 (obr. 4.25). Výsledná křivka je sice lineární, není ale dostatečně strmá. Půlvlnový potenciál hydrochinonu určený z průsečíku s osou x je + 0,83 V. Ve snaze o vysvětlení tohoto jevu byly měřeny hydrodynamické voltamogramy se změnami jednotlivých parametrů měření. Byl otestován vliv zvýšení koncentrace hydrochinonu o jeden řád ( $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ), vliv dalšího snižování uhlíkové zóny v detektoru, vliv změny pH prostředí. Proměřen byl i průběh hydrodynamického voltamogramu u askorbové kyseliny při pH 7 (obr. 4.26). Askorbová kyselina však reagovala obdobně a její půlvlnový potenciál nabývá hodnoty + 0,51 V. Deformace hydrodynamických voltamogramů tedy není charakteristickou vlastností hydrochinonu, ani není způsobena vlivem prostředí, je způsobena rozložením vkládaného potenciálu na pracovní elektrodě. Detektor tedy pracuje s nižší selektivitou, ale jeho použitelnost pro analytická měření tím není znemožněna.

Potenciál vkládaný na pracovní elektrodu se udržuje dostatečný jen na konci uhlíkového sloupce, tedy v části nejbližší referentní a pomocné elektrodě. Pokles potenciálu je směrem do hlouby uhlíkové zóny značně prudký. Teoreticky určená výška aktivní uhlíkové zóny ze stupně konverze tento jev potvrzuje – 0,75 mm je malá část z celkové uhlíkové zóny, na které je rozložení detekčního potenciálu dostatečné. Důsledkem je menší stupeň konverze coulometrického detektoru a deformace hydrodynamických voltamogramů. Všechny pozorované jevy jsou v souladu i s tubulárním uspořádáním detektoru, který pracuje s obdobným umístěním elektrod a vykazuje i obdobné problémy.

Tomu odpovídá i stupeň konverze 81,7 % určený z rovnice (4.1) pro hydrochinon stanovený coulometrickým detektorem za optimálních podmínek.



Obr. 4.25 **Vyšetření průběhu HV hydrochinonu** ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ); nosný roztok B-R pufr o pH 2, průtoková rychlost  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  a objem dávkovací cívky  $10 \mu\text{l}$ .

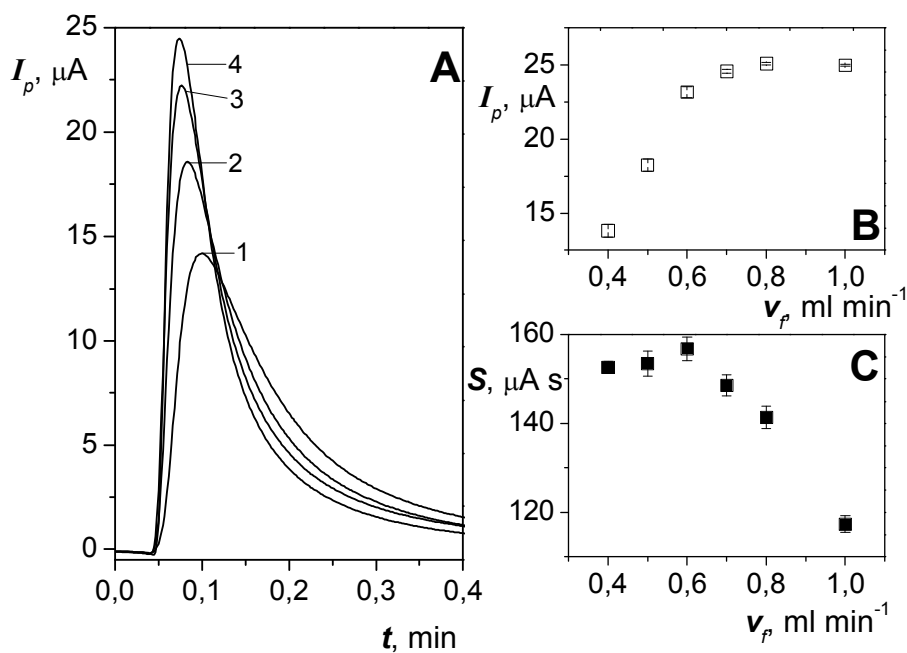


Obr. 4.26 **Hydrodynamický voltamogram askorbové kyseliny** ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) (A) znázorňující výšku píků (plné symboly) a proud pozadí (prázdné symboly) a vyšetření jeho průběhu (B); nosný roztok B-R pufr o pH 7, průtoková rychlost  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  a objem dávkování  $10 \mu\text{l}$ .



#### 4.2.5.3. Vliv průtokové rychlosti na odezvu detektoru

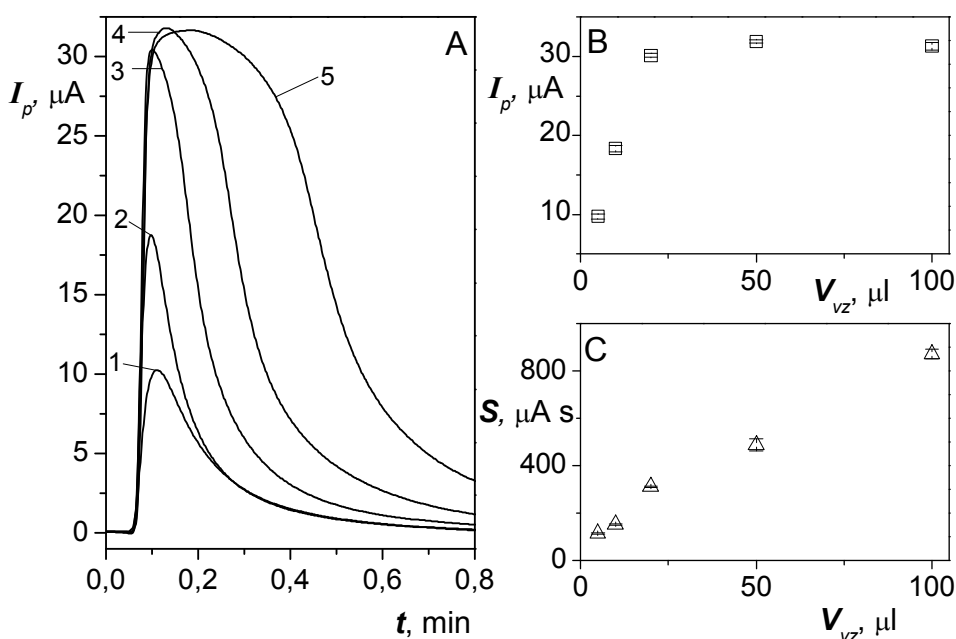
Dalším krokem optimalizace stanovení hydrochinonu je určení průtokové rychlosti, při které je pík dostatečně vysoký a zároveň je zachován vysoký stupeň konverze. Byla proměřena závislost odezvy detektoru na průtokové rychlosti nosného roztoku od 0,4 do 1,0 ml min<sup>-1</sup>. Ukázka zaznamenaných píků pro jednotlivé měřené průtokové rychlosti je znázorněna na obrázku 4.27. Při nízkých průtokových rychlostech (0,4 – 0,6 ml min<sup>-1</sup>) je hodnota plochy píků takřka konstantní, ale při dalším nárůstu průtokové rychlosti dochází k poklesu plochy píku. Průtokové rychlosti nad 0,6 ml min<sup>-1</sup> jsou tedy již moc vysoké a určitá část stanovované látky se nedostává do kontaktu s pracovní elektrodou. Optimální hodnota průtokové rychlosti byla tedy volena z intervalu od 0,4 do 0,6 ml min<sup>-1</sup>, ze které byla upřednostněna hodnota 0,5 ml min<sup>-1</sup>, protože nejde o krajní hodnotu z intervalu a při této průtokové rychlosti je dostačující výška i plocha píku.



Obr. 4.27 Vliv průtokové rychlosti na odezvu detektoru při stanovení hydrochinonu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>), ukázka tvaru píku (A) pro průtokovou rychlost 0,4 (1), 0,5 (2), 0,6 (3) 0,8 ml min<sup>-1</sup> (4) a statisticky zpracované hodnoty výšky (B) a plochy píku (C); stanovení hydrochinonu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>, nosný roztok B-R pufr o pH 2, objem dávkovací cívky 10  $\mu$ l a detekčním potenciálu + 1,2 V.

#### 4.2.5.4. Vliv objemu vzorku na odezvu detektoru

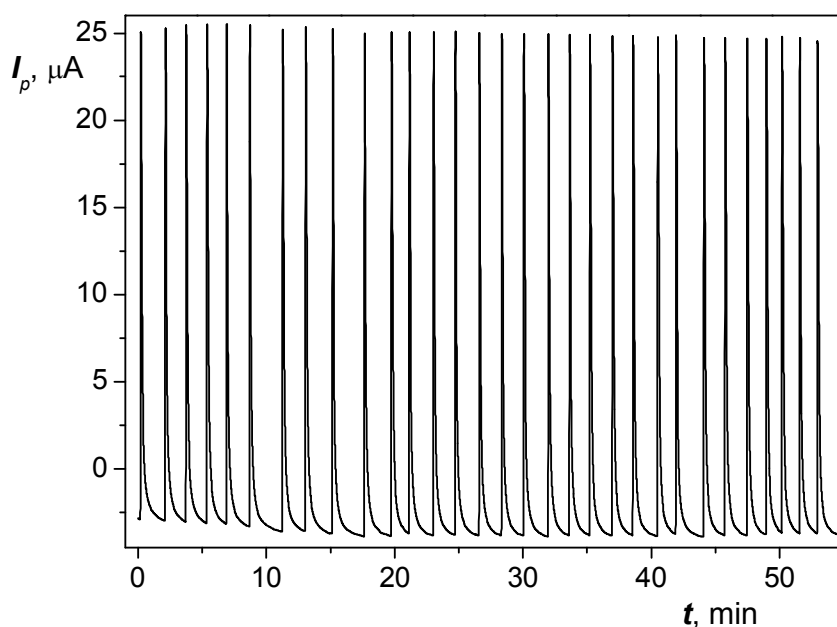
Posledním krokem optimalizace stanovení hydrochinonu je určení objemu dávkovací cívky, při kterém je výška píku blízká maximální hodnotě. Za tímto účelem byla proměřena závislost odezvy detektoru na objemu dávkovaného vzorku od 5 do 100  $\mu\text{l}$ . Ze zaznamenaných křivek (obr 4.28) je vidět, že při objemu 20  $\mu\text{l}$  je již výška píku takřka rovna maximální hodnotě a při dalším zvyšování objemu dochází již jen k nárůstu plochy píku jeho rozšiřováním. Vyšší hodnota dávkovaného vzorku již tedy nemá analytický smysl, proto byla jako optimální určena 20  $\mu\text{l}$  dávkovací cívka.



Obr. 4.28 Vliv objemu dávkovaného vzorku na odezvu detektoru při stanovení hydrochinonu, ukázka tvaru píku (A) pro objem dávkovací cívky 5 (1), 10 (2), 20 (3), 50 (4) a 100  $\mu\text{l}$  (5), závislost výšky (B) a plochy píku (C) na objemu dávkovaného vzorku; stanovení hydrochinonu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ), nosný roztok B-R pufr o pH 2, detekčním potenciálu +1,2 V a průtokové rychlosti  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ .

#### 4.2.5.5. Stálost odezvy při kontinuálním měření hydrochinonu

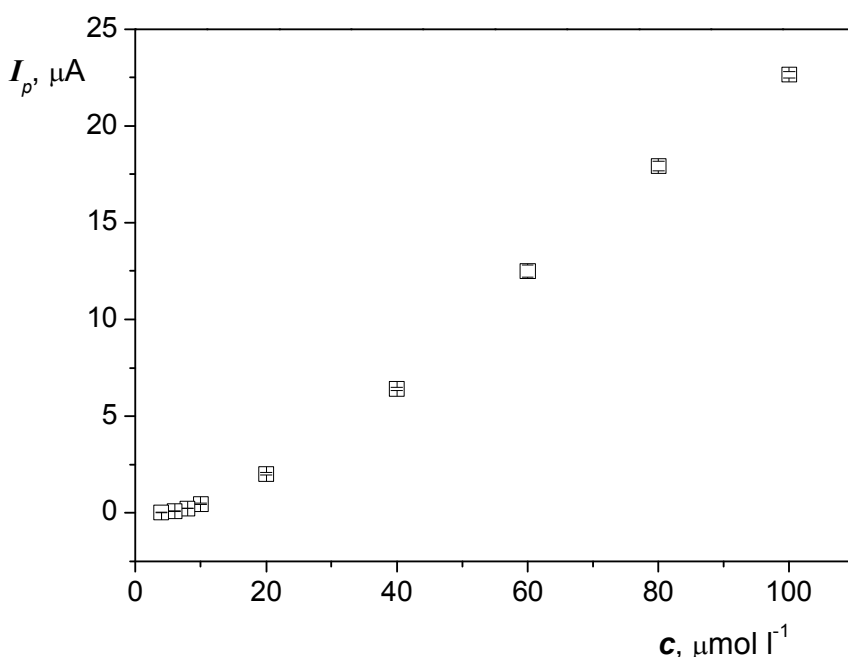
Dále bylo potřebné ověřit, jestli hydrochinon nepasivuje pracovní elektrodu, což by vedlo k negativnímu zkreslení výsledků. Pokud by docházelo k pasivaci, bylo by nutné častěji měnit náplň coulometrického detektoru. Ověření stálosti signálu bylo provedeno proměřením 30 po sobě jdoucích nástříků vzorku za optimálních pracovních podmínek. Ze záznamu pořízeného metodou FIA je vidět (obr. 4.29), že nedochází k prudkému snižování výšky píků. Relativní směrodatná odchylka pro výšku píků nabývá hodnoty 0,82 %. Odezva detektoru je tedy dostatečně stabilní a lze stanovovat hydrochinon bez projevu pasivace minimálně pro 30 po sobě jdoucích nástříků.



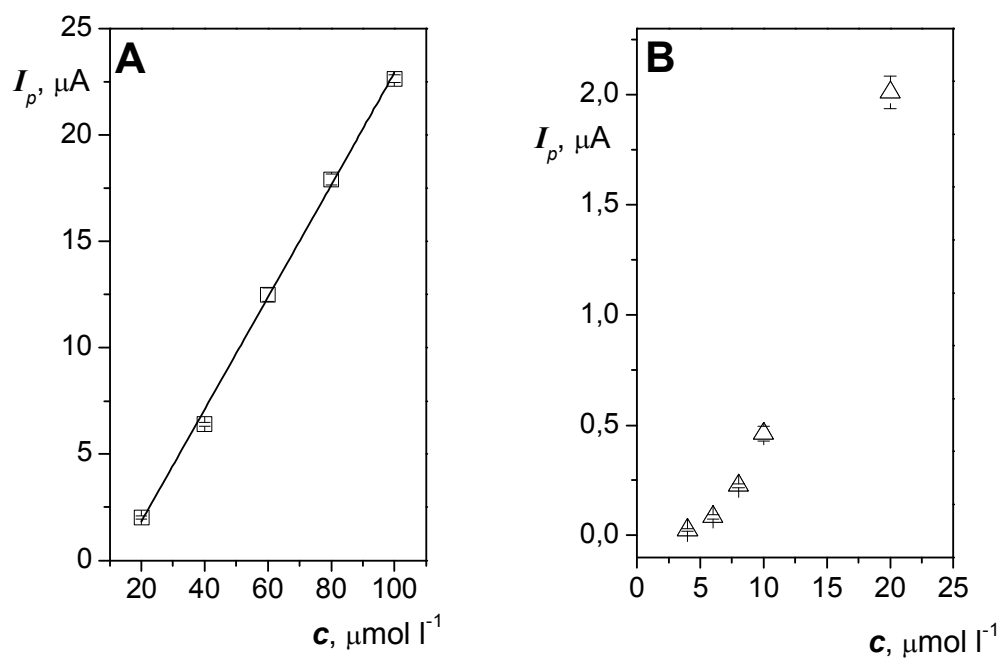
Obr. 4.29 Záznam průběhu měření stálosti signálu metodou FIA pro 30 po sobě jdoucích nástříků hydrochinonu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ); nosný roztok B-R pufr o pH 2, detekční potenciál + 1,2 V a průtoková rychlost  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  a objem dávkovací cívky  $20 \mu\text{l}$ .

#### 4.2.5.6. Kalibrační přímka při stanovení hydrochinonu

Po optimalizaci pracovních podmínek a ověření stability signálu je nutné určit rozsah koncentrací, pro který je kalibrační přímka lineární. Byly připraveny a proměřeny roztoky o různé koncentraci hydrochinonu v koncentračním rozsahu od  $1 \cdot 10^{-4}$  do  $4 \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{l}^{-1}$ . Nižší koncentraci se již stanovit nepodařilo. Na obrázku 4.30 je znázorněn graf obsahující všechny naměřené kalibrační body. Stejně jako tomu bylo v případě hexakyanoželezitanu draselného, má tato závislost velký záporný úsek. Dalším problémem je nelinearita kalibrační křivky při nižších koncentracích. Na obrázku 4.31 je znázorněna lineární část kalibrační křivky. Kalibrační křivka je lineární jen v koncentračním rozsahu od  $1 \cdot 10^{-4}$  do  $2 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{l}^{-1}$ . Vzhledem k deformaci kalibrační křivky při měření roztoků vzorku o nízké koncentraci nebyla určena mez detekce stanovení hydrochinonu.



Obr. 4.30 Úplný průběh kalibrační závislosti hydrochinonu v koncentračním rozsahu od  $1 \cdot 10^{-4}$  do  $4 \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{l}^{-1}$ ; nosný roztok B-R pufr o pH 2, detekční potenciál + 1,2 V a průtoková rychlost  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  a objem dávkovací cívky  $20 \mu\text{l}$ .



Obr4.31 **Lineární část kalibrační závislosti hydrochinonu (A) a nelineární část kalibrační křivky (B);** nosný roztok B-R pufr o pH 2, detekční potenciál + 1,2 V a průtoková rychlost  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  a objem dávkovací cívky  $20 \mu\text{l}$ .

## 5. Závěr

### 5.1. Změny povrchové struktury pastové elektrody z mikročastic skelného uhlíku vyvolané působením roztoku methanolu

Jak bylo prokázáno již dříve, GCPE jsou stabilní ve vodných roztocích methanolu [25, 30]. Pokud je koncentrace methanolu nižší než 50 %, nejsou pozorovány žádné změny v odezvě elektrody. Takový roztok má vyšší polaritu a pastovací kapalinu již nerozpouští dostatečně, takže si uhlíková pasta udržuje homogenitu, což dokládá i aplikace CPE z grafitu za těchto podmínek [57]. Při koncentraci methanolu nad 50 % dochází k ustálení signálu po 30 sekundách a dále již zůstává signál stabilní. Díky tomu je možné GCPE používat v průtokových metodách.

Změny povrchu pracovní elektrody vyvolané působením vyšších koncentrací methanolu způsobují nárůst signálu, šumu a pozadí, a to jak při voltametrických měřeních, tak i při amperometrické detekci v průtokových systémech. V případě voltametrických měření lze ještě pozorovat posun potenciálu píku k méně pozitivním hodnotám.

Konfokální mikroskopie nepotvrdila původní předpoklad, že působením methanolu dochází k vymytí pastovací kapaliny z povrchu GCPE, a tím k odhalení větší části mikrokuliček skelného uhlíku. Prokázala však nárůst hrubosti studovaného povrchu.

Větší odolnost GCPE je tedy dána mechanickým uspořádáním mikročastic a celkovou strukturou připravené pasty. Mikročástice skelného uhlíku je sférická, bez pórů, zatímco grafit je nepravidelná částice s velkým množstvím pórů. Jejich rozdílná struktura má za následek i různou podobu připravené pasty. Pasta připravená z grafitu je méně soudržná a je jen částečně spojená pastovací kapalinou. Mikročástice skelného uhlíku tvoří s olejem homogennější směs a jsou pokryty nepřetržitou vrstvou oleje. Rozdílné uspořádání má za následek větší odolnost pasty ze skelného uhlíku v době, kdy vlivem methanolu slábne opora pastovací kapaliny.

Měření hustoty pasty vystavené dlouhodobému působení roztoku methanolu prokázalo, že složení pasty se s časem mění. Tím bylo prokázáno, že uspořádání mikročastic skelného uhlíku nezabraňuje vymývání pastovací kapaliny z povrchu elektrody. Elektroda je však proti těmto změnám dostatečně robustní.

## 5.2. Tubulární coulometrický detektor plněný mikročásticemi skelného uhlíku

Coulometrické porézní detektory jsou díky vysoké citlivosti vhodnou elektrochemickou detekcí pro průtokové metody. Stále je však dostatečný prostor pro jejich inovaci. Detektory s obnovitelnou náplní jsou zatím mimo hlavní zájem vývoje, i když jak bylo prokázáno v předešlé [52] a i v této práci, jde o vhodný způsob inovace vedoucí k úspoře času i finančních prostředků.

V této práci se podařilo zkonstruovat nový detektor s obnovitelnou náplní z mikročástic skelného uhlíku, který pracuje jako coulometrický. Jeho velkou předností je jednoduchost přípravy a dostupnost materiálu pro jeho konstrukci. Byl vyvinut systém plnění, který zaručuje dostatečnou reprodukovatelnost ( $RSD = 5,5 \%$ ) a umožňuje měnit výšku uhlíkové zóny dle potřeby. Byly prozkoumány a nastíněny další možnosti úpravy plnění detektoru směřující k jeho automatizaci.

Detektor byl testován při stanovení hexakynoželezitanu draselného. Optimální podmínky pro jeho stanovení jsou průtoková rychlost  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , detekční potenciál  $+0,5 \text{ V}$  a objem plnicí cívky  $10 \text{ } \mu\text{l}$ . Nízká průtoková rychlost odpovídá teoretickému předpokladu, že coulometrické detektory potřebují k dosažení vysokého stupně konverze pracovat při nižších průtokových rychlostech. Za optimálních pracovních podmínek bylo dosaženo vysokého stupně konverze  $90,1 \%$ . Půlvlnový potenciál hydrodynamického potenciálu byl v dobré shodě s jeho teoretickou hodnotou. Za optimálních pracovních podmínek byla ověřena stálost a reprodukovatelnost signálu. Relativní směrodatné odchylky pro oba parametry se pohybovaly okolo  $2 \%$ , což je dostačující hodnota pro další analytické využití. Poslední bodem stanovení hexakynoželezitanu draselného bylo proměření kalibrační závislosti, která byla lineární v měřeném kalibračním rozsahu od  $1 \cdot 10^{-4}$  do  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ .

Při stanovení strukturálně náročnějšího hydrochinonu byly nalezeny obdobné podmínky pro stanovení: průtoková rychlost  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ , detekční potenciál  $+1,2 \text{ V}$  a objem plnicí cívky  $10 \text{ } \mu\text{l}$ . Půlvlnový potenciál byl stanoven na  $+0,83 \text{ V}$ . Za optimálních podmínek bylo dosaženo stupně konverze  $81,7 \%$ . Detektor pracoval při stálosti signálu  $0,82 \%$ . Byla proměřena kalibrační závislost od  $1 \cdot 10^{-4}$  do  $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ , která však nebyla lineární v celém koncentračním rozsahu.

Vzhledem k tomu, že je tento koncept konstrukce detektoru zpracováván zhruba rok, jsou porozumění této rozsáhlé problematiky a zkušenosti snižovány stále ještě omezeny. K analytickému použití detektoru zbývá ještě doplnit některé informace a zejména odhalit příčinu nelineárního průběhu kalibrační křivky. V každém případě jde o koncept, jehož předností je nejen jednoduchost, ale zejména snadná reaktivace pasivovaného pracovního materiálu. V této práci byly položeny základy pro další práci a rozvoj coulometrického detektoru s obnovitelnou náplní vhodného pro detekci v průtokových systémech.



## 6. Seznam použité literatury

- [1] Stulik, K., Pacakova, V., *Elektroanalyticka mereni v proudicich kapalinach*, SNTL - Nakladatelstvi technicke literatury 1989.
- [2] Rabenstein, D. L., Saetre, R., *Anal. Chem.* 1977, 49, 1036-1039.
- [3] Stojanovic, R. S., Bond, A. M., Butler, E. C. V., *Anal. Chem.* 1990, 62, 2692-2697.
- [4] Johnson, D. C., Lacourse, W. R., *Anal. Chem.* 1990, 62, A589-A597.
- [5] Caudill, W. L., Ewing, A. G., Jones, S., Wightman, R. M., *Anal. Chem.* 1983, 55, 1877-1881.
- [6] Yamada, S., Sato, H., *Nature* 1962, 193, 261-262.
- [7] Dieker, J. W., Vanderlinden, W. E., Poppe, H., *Talanta* 1978, 25, 151-155.
- [8] Lankelma, J., Poppe, H., *J. Chromatogr.* 1976, 125, 375-388.
- [9] Lewis, E. C., Johnson, D. C., *Clinical Chemistry* 1978, 24, 1711-1719.
- [10] Adams, R. N., *Anal. Chem.* 1958, 30, 1576-1576.
- [11] Kissinger, P. T., Refshauge, C., Dreiling, R., Adams, R. N., *Anal. Lett.* 1973, 6, 465-477.
- [12] Svancara, I., Vytras, K., Barek, J., Zima, J., *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2001, 31, 311-345.
- [13] Zima, J., Svancara, I., Barek, J., Vytras, K., *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2009, 39, 204-227.
- [14] Stefan, R. I., Bairu, S. G., *Talanta* 2004, 63, 605-608.
- [15] Rivas, G. A., Rubianes, M. D., Pedano, M. L., Ferreyra, N. F., *et al.*, *Electroanalysis* 2007, 19, 823-831.
- [16] Ramirez, M. T., Palomar, M. E., Gonzalez, I., Rojashernandez, A., *Electroanalysis* 1995, 7, 184-188.
- [17] Liu, H. T., He, P., Li, Z. Y., Sun, C. Y., *et al.*, *Electrochem. Comm.* 2005, 7, 1357-1363.
- [18] Svancara, I., Vytras, K., Kalcher, K., Walcarius, A., Wang, J., *Electroanalysis* 2009, 21, 7-28.
- [19] Svancara, I., Walcarius, A., Kalcher, K., Vytras, K., *Cent. Eur. J. Chem* 2009, 7, 598-656.
- [20] Vytras, K., Svancara, I., Metelka, R., *J. Serb. Chem. Soc.* 2009, 74, 1021-1033.
- [21] Lindquist, J., *Anal. Chem.* 1973, 45, 1006-1008.
- [22] Kalcher, K., Kauffmann, J. M., Wang, J., Svancara, I., *et al.*, *Electroanalysis* 1995, 7, 5-22.
- [23] Svancara, I., Hvizdalova, M., Vytras, K., Kalcher, K., Novotny, R., *Electroanalysis* 1996, 8, 61-65.
- [24] Wang, J., Kirgoz, U. A., Mo, J.-W., Lu, J., *et al.*, *Electrochem. Comm.* 2001, 3, 203-208.
- [25] Barek, J., Muck, A., Wang, J., Zima, J., *Sensors* 2004, 4, 47-57.
- [26] Jemelkova, Z., Zima, J., Barek, J., *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2009, 74, 1503-1515.
- [27] Nemcova, L., Zima, J., Barek, J., Janovska, D., *Food Chem.* 2011, 126, 374-378.
- [28] Stevic, M. C., Ignjatovic, L. M., Ciric-Marjanovic, G., Stanisic, S. M., *et al.*, *Int. J. Electrochem. Sci.* 2011, 6, 2509-2525.
- [29] Zima, J., Cienciala, M., Barek, J., Moreira, J. C., *Chem. Anal.* 2007, 52, 1049-1057.
- [30] Zima, J., Dejmkova, H., Barek, J., *Electroanalysis* 2007, 19, 185-190.

- [31] Sherwin, M., Blum, D., *Chem Systems Inc.* 1979.
- [32] Matsuda, H., *J. Electroanal. Chem.* 1967, 15, 109-127.
- [33] Gunasingham, H., *Anal. Chim. Acta* 1984, 159, 139-147.
- [34] Tijssen, R., *Anal. Chim. Acta* 1980, 114, 71-89.
- [35] Kenkel, J. V., Bard, A. J., *J. Electroanal. Chem.* 1974, 54, 47-54.
- [36] Ilcheva, L. I., Dakashev, A. D., *Analyst* 1990, 115, 1247-1249.
- [37] Beinrohr, E., Nemeth, M., Tschopel, P., Tolg, G., *Fresenius J. Anal. Chem.* 1992, 343, 566-575.
- [38] Wang, J., Dewald, H. D., *J. Electrochem. Soc.* 1983, 130, 1814-1818.
- [39] Blaedel, W. J., Strohl, J. H., *Anal. Chem.* 1964, 36, 1245-1251.
- [40] Bard, A. J., Faulkner, L. R., *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, Wiley 1980.
- [41] Sioda, R. E., *Anal. Chim. Acta* 1988, 215, 295-299.
- [42] Weast, R. C., *CRC Handbook of Chemistry and Physics 61st Ed 1980-1981*, Chemical Rubber 1981.
- [43] Schieffer, G. W., *Anal. Chem.* 1980, 52, 1994-1998.
- [44] Schieffer, G. W., *Anal. Chem.* 1979, 51, 1573-1575.
- [45] Miner, D. J., Kissinger, P. T., *Biochem. Pharmacol.* 1979, 28, 3285-3290.
- [46] Schieffer, G. W., *Anal. Chem.* 1981, 53, 126-127.
- [47] Johnson, D. C., Weber, S. G., Bond, A. M., Wightman, R. M., *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 1986, 180, 187-250.
- [48] Sawyer, D. T., Sobkowiak, A., Roberts, J. L., *Electrochemistry for Chemists*, Wiley 1995.
- [49] Polta, T. Z., Johnson, D. C., *J. Electroanal. Chem.* 1986, 209, 159-169.
- [50] Pollema, C. H., Ruzicka, J., *Anal. Chem.* 1994, 66, 1825-1831.
- [51] Ruzicka, J., *Anal. Chim. Acta* 1995, 308, 14-19.
- [52] Mayer, M., Ruzicka, J., *Anal. Chem.* 1996, 68, 3808-3814.
- [53] Mattusch, J., Baran, H., Schwedt, G., *Fresenius J. Anal. Chem.* 1991, 340, 426-430.
- [54] Svancara, I., Baldrianova, L., Vlcek, M., Metelka, R., Vytras, K., *Electroanalysis* 2005, 17, 120-126.
- [55] de Oliveira, A. C., dos Santos, S. X., Cavaleiro, E. T. G., *Talanta* 2008, 74, 1043-1049.
- [56] Dilgin, Y., Dursun, Z., Nisli, G., *Turk. J. Chem.* 2003, 27, 167-180.
- [57] Svancara, I., Vytras, K., Renger, F., Smyth, M. R., *Electrochim. Acta* 1992, 37, 1355-1361.
- [58] Danielson, N. D., Wangsa, J., Targove, M. A., *Anal. Chem.* 1989, 61, 2585-2588.
- [59] Gueshi, T., Tokuda, K., Matsuda, H., *J. Electroanal. Chem.* 1979, 101, 29-38.
- [60] Menshykau, D., Streeter, I., Compton, R. G., *J. Physic. Chem. C* 2008, 112, 14428-14438.
- [61] Sioda, R. E., *J. Electroanal. Chem.* 1972, 34, 399-409.